

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re: Application of JEON et al.

Serial No.: 09/722,776

Examiner: Navarro, A.

Date Filed: November 27, 2000

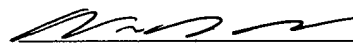
Group: 1645

For: NOVEL ENDONUCLEASE OF IMMUNE CELL, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND IMMUNE ADJUVANT USING THE SAME

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF FOREIGN PRIORITY APPLICATION

CERTIFICATE UNDER 37 CFR 1.8(a)

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the U.S. Postal Service as First Class mail in an envelope addressed to Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313 on 5-28-04

 Reg. No. 40,764

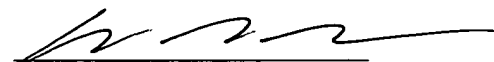
Mail Stop Issue Fee
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Priority under the International Convention for the Protection of Industrial Property and under 35 U.S.C. §119 was claimed on filing of the above-identified patent application, based upon Korean Application No. 1998-19176 filed May 27, 1998. A certified copy of the application is submitted herewith which perfects the Claim of Foreign Priority.

Respectfully submitted,

Date: 5-28-04



Mark D. Passler
Registration No. 40,764
Akerman Senterfitt
P.O. Box 3188
West Palm Beach, FL 33402-3188
Telephone: 561-653-5000

Docket No. 9250-2



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-1998-0019176
Application Number

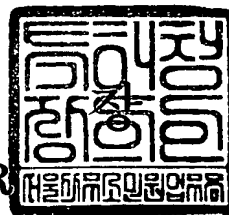
출원년월일 : 1998년 05월 27일
Date of Application MAY 27, 1998

출원인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.

2004 년 04 월 20 일

특 허 청

COMMISSIONER



10-98-019176



98.05.27

방식심사관	담당	심사관
98.5.27	98.5.27	98.5.27

【서류명】 특허출원서

【수신처】 특허청장 귀하

【제출일자】 1998.05.27

【발명의 국문명칭】 면역세포의 신규한 엔도뉴클레아제 및 이를 사용한 면역보조제

【발명의 영문명칭】 Novel Endonuclease of Immune Cell and Immune Adjuvant Using the Same

【출원인】

【국문명칭】 제일제당주식회사

【영문명칭】 CHEIL JEDANG CORPORATION

【대표자】 손경식

【출원인코드】 15002686

【출원인구분】 국내상법상법인

【전화번호】 02-726-8284

【우편번호】 100-095

【주소】 서울특별시 중구 남대문로5가 500번지 제일빌딩

【국적】 KR

【대리인】

【성명】 최학현

【대리인코드】 L137

【전화번호】 02-365-2727

【우편번호】 120-013

【주소】 서울특별시 서대문구 충정로3가 222

【대리인】

【성명】 황주영

【대리인코드】 S055

【전화번호】 02-365-2727

【우편번호】 120-013

【주소】 서울특별시 서대문구 충정로3가 222

【발명자】

【국문성명】 전영중

【영문성명】 JEON, Yeong Joong

【주민등록번호】 560326-1794411

【우편번호】 134-070

【주소】 서울특별시 강동구 명일동 주공아파트 912-705

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 박완제

【영문성명】 PARK, Wan Je

【주민등록번호】 581004-1408516

【우편번호】 442-370

【주소】 경기도 수원시 팔달구 매탄동 1211번지 한국 1차 아파트 105동 808호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 이나경

【영문성명】 LEE, Na Gyong

【주민등록번호】 610106-2452429

【우편번호】 449-080

【주소】 경기도 용인시 유방동 1007-1번지 인정프린스아파트 1004-1001

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 정상보

【영문성명】 JUNG, Sang Bo

【주민등록번호】 711122-1037920

【우편번호】 156-031

【주소】 서울특별시 동작구 상도1동 622번지

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 김두식

【영문성명】 KIM, Doo Sik

【주민등록번호】 510413-1009319

【우편번호】 120-110

【주소】 서울특별시 서대문구 연희동 84-3

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 권형주

【영문성명】 KWON, Hyung Joo

【주민등록번호】 650318-1481217

【우편번호】 120-112

【주소】 서울특별시 서대문구 연희2동 82-8

【국적】 KR

【신규성주장】

【공개형태】 학술단체 서면발표

【공개일자】 1997. 12. 31

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

최학현

대리인

황주명

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	91 면	91,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원



【합계】

120,000 원

- 【첨부서류】
1. 요약서, 명세서(및 도면) 각 1통
 2. 출원서 부분, 요약서, 명세서(및 도면)을 포함하는 FD부분 1통
 3. 위임장(및 동 번역문)
 4. 신규성의제 증명서류(면역세포의 새로운 Endonuclease에 대한 생화학적 특형과 기능 연구에 관한 연세대 박사학위 논문)(추후제출)

【요약서】

【요약】

본 발명은 면역세포로부터 분리되고 박테리아 DNA를 외부의 물질로 인식하고 프로세싱하여 면역반응에 관여하는 CpG motif를 갖는 약 10 bp의 일본쇄 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 엔도뉴클레아제, 사람의 B-림프아 IM9 세포주 또는 TPA로 처리된 골수형성 U937 세포주를 엔도뉴클레아제를 생성하기에 적절한 배지에서 배양하고 이 배양액으로부터 상기 면역세포에서 합성되어 분리된 엔도뉴클레아제를 정제함을 포함하는 상기 엔도뉴클레아제의 제조방법 및 본 발명 엔도뉴클레아제로 박테리아 DNA를 처리하여 형성된 CpG motif를 갖는 약 10 bp의 일본쇄 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 면역보조제에 관한 것이다.

【대표도】

도 39

【명 세 서】

【발명의 명칭】

면역세포의 신규한 엔도뉴클레아제 및 이를 사용한 면역보조제(Novel Endonuclease of Immune Cell and Immune Adjuvant Using the Same)

【도면의 간단한 설명】

도 1은 DNA-천연-PAGE에 의해 분석된 IM9 세포의 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 보여준다 (IM9 세포 용해물(A), 배지(B) 및 혈청이 없이 배양된 배지(C)에서의 엔도뉴클레아제 활성이 인-겔 시스템에 의해 검출되었으며 소 DNase I(레인 1)과 배양 배지 엔도뉴클레아제 활성(레인 2)이 비교되어 있다(D)).

도 2는 DNA-천연-PAGE에 의해 분석된 DNase I 및 IM9 배양 배지의 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 보여준다.

도 3은 안티-소 DNase I 항체에 의한 본 발명 엔도뉴클레아제 활성의 면역침강을 보여준다.

도 4는 IM9 세포를 액티노마이신 D로 예비처리하고 본 발명 엔도뉴클레아제의 분비를 보여준다 (세포 용해물(A)과 배양 배지(B)의 엔도뉴클레아제 활성이 예

비처리후 표시된 배양 기간동안에 분석되었다).

도 5는 면역 세포주의 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 비교분석한 것이다.

도 6은 DNA-천연-PAGE에 의해 분석된 IFN- γ or IL-1 β 처리된 IM9 세포 배양 배지 및 세포 용해물의 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 보여준다.

도 7은 본 발명 엔도뉴클레아제의 활성을 위한 최적 pH를 보여준다.

도 8은 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 위한 2가 양이온의 필요요건을 보여준다 (A는 엔도뉴클레아제를 20 mM Tris-HCl, pH 7.0중의 표시된 농도의 Ca²⁺ 및/또는 Mg²⁺의 존재 또는 부재하에 37에서 10분간 100 ng의 플라스미드 DNA와 반응시킨 결과이며 B는 효소반응을 10 mM Mg²⁺의 존재하에 180분간 실시한 결과이다).

도 9는 TPA, LPS 및 CHX 처리된 U937 세포의 증식 곡선을 나타낸 것이다.

도 10은 U937 세포에서 TPA-농도 의존성으로 본 발명 엔도뉴클레아제의 합성 및 분비를 DNA-천연-PAGE에 의해 분석한 결과이다 (표시된 TPA 농도에서 24시간 배양하여 세포 용해물(A) 및 배양배지(B)를 얻었다).

도 11은 인-겔 시스템에 의해 분석된 TPA 처리된 U937 세포 용해물 및 배양 배지의 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 보여준다.

도 12는 LPS 처리된 U937 세포 용해물 및 배양배지의 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 보여준다 (세포 용해물(A) 및 배지(B)의 엔도뉴클레아제 활성이 DNA-천연-PAGE에 의해 1 ng/ml LPA 처리후 표시된 배양 기간에서 분석되었다).

도 13는 자극 인자로 처리된 U937 세포의 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 보여준다 (레인 1은 48시간동안 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배지에서의 U937 세포 배양물, 레인 2는 48시간동안 TPA(10 ng/ml) 처리, 레인 3은 24시간동안 LPS(1 ng/ml) 처리, 레인4는 12시간동안 CHX(10 ug/ml) 처리한 것이다).

도 14은 자가분해 방법에 의해 IM9 세포로부터 분리된 핵에서의 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 보여준다.

도 15는 CHX 처리에 의한 IM9 세포의 apoptotic 세포사멸을 보여준다.

도 16은 DNA-천연-PAGE에 의해 분석된 IM9 세포 용해물 및 핵의 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 보여준다.

도 17은 본 발명 엔도뉴클레아제의 활성을 위한 2가 양이온의 필요요건을 보여준다.

도 18은 본 발명 엔도뉴클레아제에 의한 플라스미드 DNA의 시간 경과에 따른 분해를 보여준다.

도 19는 이. 콜라이 DNA, IM9 세포 DNA 및 연어 정자 DNA에 대한 엔도뉴클레아제의 반응 산물을 보여준다.

도 20은 IM9 세포내로 도입된 외래 DNA의 썬던 블롯 분석 결과이다.

도 21은 본 발명 엔도뉴클레아제 반응에 의해 수득된 DNA 절편의 클로닝 및 서열분석을 위한 구성도이다.

도 22는 IM9 세포에서 박테리아 DNA의 프로세싱에 의해 생성된 DNA 절편을 보여준다.

도 23은 U937 세포에서 박테리아 DNA의 프로세싱에 의해 생성된 DNA 절편을 보여준다.

도 24는 본 발명 엔도뉴클레아제의 반응 산물의 검출 결과이다.

도 25는 박테리아 DNA 또는 올리고뉴클레오타이드내의 CpG motif에 의한 IgM 분비의 유도를 보여준다.

도 26은 기질로서 EC1 PCR 산물을 사용한 본 발명 엔도뉴클레아제 반응의 산물을 보여준다.

도 27은 기질로서 EC2 PCR 산물을 사용한 본 발명 엔도뉴클레아제 반응의 산물을 보여준다.

도 28은 기질로서 HC1 PCR 산물을 사용한 본 발명 엔도뉴클레아제 반응의 산물을 보여준다.

도 29는 Zn^{2+} 및 EDTA에 의한 엔도뉴클레아제 활성의 억제를 보여준다.

도 30은 표시된 IM9 세포 배양 배지 양과 반응된 EC1 PCR 산물로부터 본 발명 엔도뉴클레아제 반응의 산물을 보여준다.

도 31은 표시된 시간동안 EC1 PCR 산물과 반응된 엔도뉴클레아제로부터의 산

물을 보여준다.

도 32는 본 발명 엔도뉴클레아제 활성이 EC2 PCR 산물(157 bp) 및 *Alu* I에 의해 분해된 짧은 DNA 절편을 비교하여 준다.

도 33은 IM9 세포에서 분비된 본 발명 엔도뉴클레아제의 3'-엑소뉴클레아제의 동정을 보여준다.

도 34는 본 발명 엔도뉴클레아제 반응 산물, IM9 세포에 의해 프로세싱된 산물 및 DNase I 반응 산물을 비교하여 준다.

도 35는 S1 뉴클레아제 반응에 의한 엔도뉴클레아제 반응으로부터 유도된 일 본쇄 절편의 동정을 보여준다.

도 36은 모노 S HR5/5 이온 교환 크로마토그래피에 의한 IM9 세포 배양 배지의 크로마토그래피 분획 결과를 보여준다.

도 37은 RESOURCE PHE 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한 엔도뉴클레아제의 정제 결과를 보여준다.

도 38은 이온 교환 크로마토그래피 및 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한 정제된 본 발명 엔도뉴클레아제의 SDS-PAGE 결과를 보여준다.

도 39는 SDS-PAGE에 의한 정제된 엔도뉴클레아제의 분자량 결정 결과를 보여준다.

도 40은 본 발명 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 모노 S 크로마토그래피 분획의 천연-기공 구배 겔 전기영동(4-15%) 결과(B) 및 아가로스 겔 전기영동에서 패널 B의 겔 밴드로부터 용출된 단백질의 엔도뉴클레아제 활성(B)을 보여준다.

도 41은 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제된 본 발명 엔도뉴클레아제의 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 활성 밴드의 천연-구배 PAGE 겔 용출 결과를 보여준다.

도 42는 분리된 U937 세포핵내의 정제된 엔도뉴클레아제 활성에 미치는 양이온의 영향을 보여준다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 면역세포로부터 분비되고 박테리아 DNA를 외부의 물질로 인식하고 프로세싱(Processing)하여 면역반응에 관여하는 것으로 알려진 CpG motif를 생성하는 신규한 엔도뉴클레아제(endonuclease) 효소 및 이 효소를 사용하여 목적하는 백신 항원별로 특이하게 얻어지는 올리고뉴클레오타이드 유래 면역 보조제에 관한 것이다.

포유동물은 외부 물질의 침입에 대한 방어수단으로 면역체계를 구축하게 되며 선천(비특이성) 면역과 후천성(항원-특이성) 면역이 존재한다. 선천 또는 비특이성 면역은 한 종이 가지고 있는 질병에 대한 일차적인 저항인데 구조적, 생리적, 세포내적(endocytic)과 식세포적(phagocytic), 그리고 염증반응 방어벽 등 네 가지 형태의 방어벽을 형성한다. 구조적 방어벽의 예로는 피부와 점액의 막을 들 수 있고, 생리적 방어벽으로는 온도, pH, 산소압, 여러 수용성 인자들이 존재한다. 그리고 세포내 및 식세포 방어벽에 의해서는 세포 외부의 거대분자들을 세포내이입(endocytosis)과 식작용(phagocytosis)을 통하여 세포 내부로 끌어 들여 소화하는 체계이며, 염증반응의 방어벽으로는 박테리아의 침입에 의한 조직의 피해 때문에 여러 종류의 혈관작용성이고 주화성인 인자들을 유도하여 일어나는 염증반응이다. 후천성 면역은 특이성, 다양성, 기억, 그리고 자기/비자기 인식을 가지는 특성에서 선천 면역과 차이가 있다. 이러한 후천성 면역의 특성은 B 임파구, T 임파구, 항체, 그리고 사이토카인 등의 작용에 의해 일어나는 체액성 면역(humoral immunity)과 세포성 면역(cellular immunity)에 의해 일어난다.

미생물의 침입에 대한 면역 방어는 침입 초기에 빠르게 미생물의 특이한 형태의 분자들을 인식하는 선천 메카니즘에 의해 일어난다. 미생물에 존재하는 단백질 그리고 지질은 항원에 특이하게 반응하는 면역체계를 유발하는 물질로 잘 알려져 있고, LPS, 포르밀 메티오닌, 리포아라비노만난(lipoarabinomannan), 그리고 펩티도글라이칸(peptidoglycan) 등은 임파구, 식세포, 그리고 보체 체계를 직접 활성화시키는 물질로 잘 알려져 있다[Marrack, P., and Kappler, J. W. (1994) *Cell* 76, 323-332]. 최근에 많은 연구자들에 의해 포유동물이 박테리아 DNA를 자신의 DNA와 구별하여 외부의 물질로 인식함으로써 체액성 면역과 세포성 면역을 활성화시키고, 또한 선천 면역에도 기여하는 것으로 알려지고 있다.

자가면역질환인 전신성홍반성 루프스(SLE)에서 안티-DNA 항체가 많이 생성된다는 사실로부터 DNA를 항원 또는 자가항원(autoantigen)의 관점에서 연구하게 되었다. SLE의 혈청학적인 최대 관심 사항은 안티-DNA 항체들이며, 이러한 자가면역 질환에 의해 일어나는 신장의 피해, 피부의 발진, 관절염 등에 중요한 매개체로 작용한다는 것이다[Tan, E. M. (1989) *A Textbook in Rheumatology*, 11th Ed. D. J. McCarty, ed. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1049; Isenberg, D. A. et al (1997) The role of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus - A review and introduction to an international workshop on DNA antibodies held in London, May 1996 *Lupus* 6, 290-304; Swaak, A. J. G. et al (1979) *Arthritis*

Rheum. 22, 226-235; 및 Isenberg, D. A. et al (1994) *Arthritis Rheum.* 37, 169-180]. 이러한 항체들은 ssDNA와 dsDNA에 존재하는 구조결정 인자에 결합함이 밝혀졌고[Isenberg, D. A. et al (1994) *Arthritis Rheum.* 37, 169-180; Pisetsky, D. S. (1992) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 18, 437-454; 및 Shoenfeld, Y., and Isenberg, D. A. (1989) *Immunol. Today* 10, 123-126] 이 질병의 원인은 정확하게 알려지지 않았지만, 최근의 연구에서 DNA 항원이 중요한 역할을 한다는 강력한 증거들을 제공하였다[Shlomchik, M. J. et al (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9150-9154; Shlomchik, M. J. et al (1990) *J. Exp. Med.* 171, 265-292; 및 Tillman, D. M. et al. (1992) *J. Exp. Med.* 176, 761-779]. 연구자들은 박테리아 DNA에 대한 면역반응을 연구하기 위하여 정상인 마우스와 자가면역질환이 있는 마우스를 모델로 이용하였다[Gilkeson, G. S. et al (1989) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 51, 1482-1486; Gilkeson, G. S. et al (1993) *J. Immunol.* 151, 1353-1364; 및 Gilkeson, G. S. et al (1995) *J. Clin. Invest.* 95, 1398-1402]. 포유동물의 DNA와는 달리 박테리아 DNA는 폴리클로날 B세포를 활성화시키고 마우스에서 특이성을 가진 항체를 생성시키는 강력한 면역학적인 특성을 가지고 있다[Gilkeson, G. S. et al (1995) *J. Clin. Invest.* 95, 1398-1402; 및 Gilkeson, G. S. et al (1991) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 59, 288-300]. 이러한 활성도는 박테리아와 포유동물의 DNA에 존재하는 염기서열 motif의 차이 때문이며, 이들이 외부물질 즉, 비자기로 인식될 수 있기 때문이다[Messina, J. P. et al (1993) *Cell. Immunol.* 147, 148-157; Krieg, A. M. et al (1995) *Nature* 374, 546-549; 및

Halpern, M. D. et al (1996) *Cell. Immunol.* 167, 72-78]. 정상 마우스에 박테리아 DNA를 면역시키면 박테리아의 dsDNA에 대한 항체뿐만 아니라 포유동물과 박테리아의 ssDNA에도 결합할 수 있는 항체가 생성되었다[Gilkeson, G. S. et al (1991) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 59, 288-300]. 그러나 포유동물 dsDNA에 교차반응(cross-reactive)한 자가항체는 생성되지 않았다. 정상의 마우스에서와는 달리, 조기자가면역(preautoimmune) (NZB X NZW) F_1 (NZB/W) 마우스에 박테리아 dsDNA를 면역시키면 포유동물의 dsDNA에 결합하는 교차반응하는 항체가 생성되었다[Gilkeson, G. S. et al (1995) *J. Clin. Invest.* 95, 1398-1402]. 이와 같은 결과에서 자가면역질환이 유발된 마우스는 박테리아 DNA를 면역시킬 때 포유동물 DNA에 교차반응하는 안티-dsDNA 항체를 생성할 수 있는 능력을 가지며, 이것은 NZB/W 마우스에서 면역조절자의 결함으로 박테리아 DNA에 의해 생성된 자가반응한 안티-dsDNA B 세포가 자기 자신의 DNA에 반응하는 잘못된 관용이 나타났고, 따라서 박테리아의 dsDNA 뿐만 아니라 자기 자신의 dsDNA에 반응하는 병원성의 자가항체가 증가했기 때문이다[Whoch, M. K. et al (1997) *J. Immunol.* 158, 4500-4506].

단백질 항원에 대하여 B 세포가 자극을 받아 활성화되어 항체가 생성되는 과정은, 항원표현세포(antigen presentation cell: APC)에 의하여 단백질 항원이 프로세싱되어 주요조직적합항원계(major histocompatibility complex: MHC) 분자와 결합하여 항원을 표현해주어 MHC-제한된 T세포가 활성화되고, 활성화된 T 세포가 사이토카인을 분비하여 B 세포를 활성화시키기 때문이라고 잘 알려져 있다[Parker,

D. C. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11, 331-360; 및 Clark, E. A., and Ledbetter, J. A. (1994) *Nature* 367, 425-428]. 또한 단백질 항원과는 다른 마이코박테리아 (mycobacteria)의 세포벽 구성 성분의 프로세싱된 형태인 마이콜산 지질, 리포아라 비노만 리포글리칸(LAMs)은 hCD1b[Beckman, E. M. et al (1994) *Nature* 372, 691-694; Bendelac, A. (1995) *Science* 269, 185-186; Sieling, P. A. et al (1995) *Science* 269, 227-230; 및 Prigozy, T. I. et al (1997) *Immunity* 6, 187]와 hCD1c[Beckman, E. M. et al (1996) *J. Immunol.* 157, 2795-2803]가 표현할 수 있다고 알려져 있다. CD1 류는 MHC분자와 다른 위치에 코딩된 비다형성 세포표면 당단백질로 CD1-T 세포 상호 결합은 명확하게 밝혀지지 않았으나, mCD1d1은 CD8⁺ 와 CD4⁺ T 세포에 의해 인식되고[Castano A. R. et al (1995) *Science* 269, 223-226; 및 Cardell, S. et al (1995) *J. Exp. Med.* 182, 993-1004], hCD1b는 CD4⁻CD8⁻ T 세포에 의해 인식된다고[Bendelac, A. (1995) *Science* 269, 185-186] 밝혀진 바 있다. 즉, 병원성 미생물에서 발견되는 단백질이 아닌 여러 항원들의 표현에 CD1이 관여할 것이라고 추정하고 있다. 안티-DNA-특이성 B 세포 자극에 DNA가 관련되어 있다는 단서는 여러 연구 결과에서 관찰되었다. Krishnan 과 Marion은 DNA를 펩타이드와 결합하여 마우스에 면역했을 때 anti-DNA항체가 생산됨을 보여주었다 [Krishnaa, M. R., and Marion, T. N. (1993) *J. Immunol.* 150, 4948-4957]. 따라서 여러 자가면역질환에서 안티-DNA항체가 존재한다는 점에서, 이러한 안티-DNA 항체 생산을 위한 B 세포의 활성화가 MHC-제한된 T 세포 자극에 의존하는지를 확인하는 것은 중요한 의미를 가진다. Waisman 등은 DNA가 특이하게 T 세포를 활성화하는

것은 MHC class II 분자에 의한 DNA 표현과 관련이 있다고 제안하였다[Waisman, A. et al (1996) *Cell. Immunol.* 173, 7-14]. 즉, APC의 표면에 있는 MHC class II 분자들과 DNA가 결합하여 T 세포가 DNA에 특이적으로 증식할 수 있다는 사실을 밝혔으며, 이러한 결과로부터 DNA가 자가면역질환에 중요한 역할을 수행할 것이라고 제안하였다. 그러나 DNA 항원의 프로세싱 및 표현 메카니즘에 관한 연구 및 정보는 거의 없는 상태이다. 실제로 박테리아 DNA가 단백질 항원처럼 APC에서 프로세싱되고 MHC 분자들에 의해 표현되는지, 아니면 표현에 관여하는 다른 분자가 존재하는지에 대한 정보는 거의 밝혀져 있지 않다.

많은 연구자들은 박테리아의 DNA도 척추동물에 의해 자기의 DNA와 구별되어 면역세포를 활성화시키는데 기여한다고 밝혔다. 척추동물에 의해 비자기로 인식되어지는 박테리아 DNA가 가지는 특성은 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오타이드가 나타날 빈도가 높다는 것이다. 박테리아 DNA와 척추동물의 DNA사이에 존재하는 현저한 차이점을 정리하면 다음과 같다. 첫째로, CpG 디뉴클레오타이드의 발생 빈도가 박테리아 DNA에서는 16개의 디뉴클레오타이드에서 1번으로 높게 나타나는데 척추동물에서는 박테리아와 비교해 약 1/4 정도만 나타난다는 점이다. 즉, 척추동물의 DNA에는 CpG 억제자가 존재함을 의미하는 것이다[Bird, A. P. (1995) *Trends Genet.* 11, 94-100]. 둘째로, 박테리아 DNA에 존재하는 CpG 디뉴클레오타이드는 메틸화의 빈도가 낮다는 것이다. 척추동물에서는 약 80%가 메틸화되어 있는 반면에 미생물의 사이토신(cytosine)에는 메틸화가 거의 일어나지 않은 상태로 존재한다[Razin, A.,

and Friedman, J. (1981) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 25, 33-52]. 세째로, 박테리아의 CpG 디뉴클레오타이드에 두개의 5'-퓨린과 두개의 3'-피리미딘이 양쪽 끝에 나타날 빈도가 척추동물의 DNA에서 보다 높다는 것이다[Razin, A., and Friedman, J. (1981) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 25, 33-52]. 이러한 박테리아 DNA의 특이한 구조를 CpG motif라 부르는데 이 구조가 면역작용을 활성화시키는 것으로 밝혀졌다. 즉, CpG 디뉴클레오타이드 양쪽에 두개의 5'-퓨린과 두개의 3'-피리미딘이 존재할 때가 (미토겐 CpGs) 다른 염기들이 존재할 때(비자극 CpGs) 보다 면역세포 활성화가 훨씬 높게 나타난다.

박테리아 DNA의 특징적인 염기서열에 의한 면역세포의 활성화 및 기능을 연구하기 위하여 많은 연구자들이 합성한 올리고데옥시리보뉴클레오타이드(ODN)를 이용하였다. Yamamoto[Yamamoto, S. et al (1992) *J. Immunol.* 148, 4072-4076]와 다른 연구자[Cowdery, J. S. et al (1996) *J. Immunol.* 156, 4570-4575; 및 Ballas, Z. K. et al (1996) *J. Immunol.* 157, 1840-1845]들에 의하면 박테리아 DNA에 의해 NK 세포의 용해활성을 증가시키고 인터페론- γ (IFN- γ)생산을 유도함을 밝혔는데, 이러한 효과는 박테리아 DNA가 가지는 CpG motif의 회귀성(palindromic) 염기서열과 관련이 있는 것으로 보고하였다[Kuramoto, E. et al (1992) *Jpn. J. Cancer Res.* 83, 1128-1131; 및 Kimura, Y. et al (1994) *J. Biochem.* 116, 991-994]. 또한 다른 연구자들은 박테리아 DNA가 DNA-결합 단백질들과 결합하고 B 세포 활성화를 유도한다고 밝혔다[Gilkeson, G. S. et al (1995) *J. Clin. Invest.* 95,

1398-1402; Yamamoto, S. et al (1992) *J. Immunol.* 148, 4072-4076; Gilkeson, G. S. et al (1989) *J. Immunol.* 142, 1482-1486; Messina, J. P. et al (1991) *J. Immunol.* 147, 1759-1764; Field, A. K. et al (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 1004-1010; 및 Oehler, J. R., and Herverman, R. B. (1978) *Int. J. Cancer* 21, 221-220]. 즉, 박테리아의 6개 염기로 구성된 CpG motif에 의하여 B 세포 활성화가 촉진된다는 것이다. B 세포 활성화와 함께 박테리아의 감염에 의한 면역반응의 특징은 면역조절자인 사이토카인들을 생산한다는 것이다[Van Damme, J. et al (1989) *Eur. J. Immunol.* 19, 163-168; 및 Paul, W. E. et al (1993) *Adv. Immunol.* 53, 1-29]. 또한 CpG motif는 세포성 면역에 관여하는 IL-12와 체액성 면역에 관여하는 IL-6의 분비에도 관여한다고 밝혀졌다[Halpern, M. D. et al (1996) *Cell. Immunol.* 167, 72-78; Yi, A.-K. et al (1996) *J. Immunol.* 157, 5394-5402; 및 Klinman, D. M. et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2879-2883]. 이렇게 생산된 사이토카인으로서는 T 세포와 B 세포를 활성화시키는데 기여하는 IL-6[Uyttenhove, C. et al (1988) *J. Exp. Med.* 167, 1417-1427; Muraguchi, A. et al (1988) *J. Exp. Med.* 167, 332-344; Le, J. M., and Vilcek, J. (1989) *Lab. Invest.* 61, 588-602; 및 Hirano, T. et al (1990) *Immunol. Today* 11, 443-449]와 세포내부와 외부의 병원균을 제거시키는 역할을 수행하는 대식세포의 기능을 증진시켜주는 IFN- γ [Murray, H. W. (1990) *Diagn. Microbial. Infect. Dis.* 13, 411-421], 그리고 IFN- γ 의 생산을 조절하고 NK 세포의 활성화에 기여하는 IL-12가 있다[Trinchieri, G. (1994) *Blood* 84, 4008-4027; Zhan, Y., and Cheers, C.

(1995) *Infect. Immun.* 63, 1387-1390; 및 Bohn, E. et al (1994) *Infect. Immun.* 62, 3027-3032]. IL-12와 IFN- γ 는 제1형 사이토카인 생산을 증가시켜[Klinman, D. M. et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2879-2883; Zhan, Y., and Cheers, C. (1995) *Infect. Immun.* 63, 1387-1390; Bohn, E. et al (1994) *Infect. Immun.* 62, 3027-3032; 및 Heinzl, F. P. et al (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7011-7015] 사람의 병원균을 제거시키는데 중요한 역할을 수행한다. IL-6는 제2형 사이토카인으로 T 세포와 B 세포의 성장과 분화를[Uyttenhove, C. et al (1988) *J. Exp. Med.* 167, 1417-1427; Muraguchi, A. et al (1988) *J. Exp. Med.* 167, 332-344; Le, J. M., and Vilcek, J. (1989) *Lab. Invest.* 61, 588-602; 및 Hirano, T. et al (1990) *Immunol. Today* 11, 443-449] 촉진시켜 항체 생산을 자극한다[Hirano, T. et al (1986) *Nature* 324, 73-76]. 실제로 IL-6 유전자를 파괴시킨 기절시킨 쥐는 감염이 쉽게 됨을 관찰하였다[Yi, A.-K. et al (1996) *J. Immunol.* 157, 5394-5402; 및 Libert, C. et al (1994) *Eur. J. Immunol.* 24, 2237-2242]. 따라서 박테리아 DNA는 세포성 면역과 체액성 면역에 관여하는 사이토카인의 생산을 유도하는 것으로 이해된다. 또한 박테리아 DNA에 의해서 B 세포의 증식과 항체생산이 유도됨이 최근 들어 지속적으로 보고되고 있다[Krieg, A. M. et al (1995) *Nature* 374, 546-549; Liang, H. et al (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 1119-1129; 및 Yi, A.-K. et al (1996) *J. Immunol.* 156, 558-564]. Krieg 등의 연구[Krieg, A. M. et al (1995) *Nature* 374, 546-549]에 의하면 ODN에 존재하는 CpG motif가 B 세포를 활성화시켜 증식이 일어나고 IgM 분비가 유도되는 데에 필수 요

견임을 밝혔고, B 세포 활성화때 나타나는 대표적인 현상인 class II MHC분자의 발현이 증가되고 세포주기가 G₀에서 G₁으로 시작되었음을 보여주었다. Sato 등의 연구 [Sato, Y. et al (1996) *Science* 273, 352-354]에 의하면 짧은 CpG motif를 가진 면역자극 DNA 서열(ISS)이 존재하는 플라스미드 DNA를 단핵세포내에 형질감염시켰을 때 IFN- α , IFN- β , 그리고 IL-12의 양이 증가함을 볼 수 있었다. 이 연구의 결과로부터 ISS를 함유하고 있는 플라스미드를 골수 간(stem)세포들로 형질감염시키면 주위의 대식세포와 T 세포를 활성화시켜 생체내에서 간세포의 재배치가 잘못 일어날 수 있다는 사실을 알 수 있다. 그래서 체세포 또는 간세포의 유전자를 교체하는 치료법에 이용하기 위한 벡터는 ISS가 없도록 고안되어야 할 것이다. 반면에 유전자 백신을 위해서는 플라스미드 DNA에 많은 ISS가 반복되어 있도록 만드는 것이 효율을 높일 수 있는 한가지 방법임을 지적할 수 있다.

박테리아 DNA가 세포를 활성화시키기 위해서는 세포내로 유입되어야 한다. 세포배양 용기에 부착된 ODN은 B 세포를 활성화시키지 못하고[Krieg, A. M. et al (1995) *Nature* 374, 546-549], 올리고뉴클레오타이드를 리포펙션(lipofection)시켰을 때는 세포내로의 유입이 증가하고 NK세포의 활성이 크게 증가된다고 밝혀졌다[Yamamoto, T. et al, (1994) *Microbiol. Immunol.* 38, 831-836]. 그리고 CpG motif를 가졌거나 가지지 않은 올리고뉴클레오타이드 모두가 세포 표면에 결합하는 데는 큰 차이가 없음이 밝혀졌다[Krieg, A. M. et al (1995) *Nature* 374, 546-549; 및 Yamamoto, T. et al, (1994) *Microbiol. Immunol.* 38, 831-836]. 단핵세포에

유입된 DNA는 endosomal compartment 안에서 분해되는 것이 확인되었고[Bennett, R. M. et al (1985) *J. Clin. Invest.* 76, 2182-2190], 대식세포에서 박테리아 DNA와 전사인자 핵인자-kB가 결합하고 TNF- α , IL1 β 그리고 플라스미노겐 활성화제 억제제-2 mRNA의 발현이 크게 증가함을 보여주었다[Stacey, K. J. et al (1996) *J. Immunol.* 157, 2116-2122]. 세포표면의 수용체를 매개로 한 올리고뉴클레오타이드의 세포내 유입은 세포내이입(endocytosis)에 의해서 일어날 것으로 예상되었으며[Bennett, R. M. et al (1985) *J. Clin. Invest.* 76, 2182-2190], 말초혈액, 골수 세포, 그리고 류케미아 세포주에서 형광표지된 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오타이드를 이용하여 연구하여 왔으나[Loke, S. L. et al (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3474-3478; Yakubov, L. A. et al (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6454-6458; 및 Zhao, Q. et al (1996) *Blood* 88, 1788-1795] 특성 규명과 메커니즘이 밝혀지지 않는 상태이다.

지금까지 박테리아 DNA가 면역체계에서 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있으며 박테리아 DNA가 안티-DNA 항체 생성의 원인을 제공하여 자가면역질환인 SLE가 발생됨이 알려졌다. 또한 박테리아 DNA의 CpG motif가 면역세포내에 유입되어 세포를 활성화시켜 사이토카인들의 분비 및 IgM분비를 촉진하는 것으로 알려졌다. 그러나 이렇게 중요한 역할을 수행하는 박테리아 DNA가 SLE에서 어떤 메커니즘에 의해 항체를 생성하는데 기여하며, 또한 CpG motif를 가지는 올리고뉴클레오타이드가 세포내에서 어떻게 생성되는지에 대한 연구 결과는 지금까지 보고된 바 없다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명에서는 사람의 B-림프아 IM9 세포주와 분화된 골수발생 (myelogeneous) U937 세포주에서 특징적으로 생합성, 분비되는 특이한 엔도뉴클레아제의 존재를 발견하여 그 생화학적 특성을 규명하였고, 이 엔도뉴클레아제가 박테리아 DNA의 항원 프로세싱에 요구된다는 일련의 실험적 결과와 아울러 특히, CpG motif를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 생성에 필수적인 효소임을 밝혀내었다.

【발명의 구성 및 작용】

한 가지 관점에서, 본 발명은 면역세포로부터 분비되고 박테리아 DNA를 외부의 물질로 인식하고 프로세싱하여 면역반응에 관여하는 CpG motif를 갖는 약 10 bp의 일본쇄 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 신규한 엔도뉴클레아제를 제공한다. 본 발명의 엔도뉴클레아제는 SDS-PAGE에 의한 분자량 측정결과 72.4 kD로 확인되었다.

다른 관점에서, 본 발명은 사람의 B-림프아 IM9 세포주 또는 TPA로 처리된 골수형성 U937 세포주를 상기된 엔도뉴클레아제를 생성하기에 적절한 배지에서 배양하고 이 배양액으로부터 상기 면역세포에서 합성되어 분비된 엔도뉴클레아제를 정제함을 포함하는 상기 엔도뉴클레아제의 제조방법을 제공한다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 상기 엔도뉴클레아제로 박테리아 DNA를 처리하여 형성된 CpG motif를 갖는 약 10 bp의 일본쇄 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 면역보조제를 제공한다.

본 발명은 이하 실시예를 통하여 상세하게 설명될 것이다.

실시예 1

면역세포에서 본 발명 엔도뉴클레아제의 합성 및 분비

DNase I의 효소활성은 사람의 조직과 체액에 넓게 분포되어 있으며 이에 따라 소화 기능[Nadano D. et al (1993) *Clin. Chem.* 39, 448-452; 및 Yasuda T. et al (1993) *Clin. Chim. Acta.* 218, 5-16] 이외에 생리적인 생체내 기능이 존재할 것이라고 추정되어왔다. DNase I은 apoptosis 과정중에 뉴클레오솜간(internucleosomal) DNA를 절단하는 것으로 알려진[Peitsch M. C. et al (1993) *EMBO J.* 12, 371-377] 한편 이 효소는 사람의 혈청에도 존재하여 그 생화학적 특성이 보고되었다[Love J. D., and Hewitt R. R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12588-12594; 및 Kishi K. et al (1990) *Am. J. Hum. Genet.* 47, 121-126]. 혈청의 DNase I은 체장에서 분비된다고 밝혀졌으나[Love J. D., and Hewitt R. R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12588-12594; 및 Ito K. et al (1984) *J. Biochem.* 95, 1399-1406], 다른 조직에서의 연구는 아직도 계속되고있다. Messina 등의 연구결과

[Messina, J. P. et al (1991) *J. Immunol.* 147, 1759-1764]에 의하면 DNase I은 박테리아의 DNA를 완전히 분해하여 B 세포와 대식세포를 활성화시키는 CpG motif를 생성시키지 못함을 밝혔다. 반면에 DNase I을 처리하지 않은 박테리아 DNA는 면역 세포들을 활성화시켜 사이토카인과 IgM분비를 촉진시킨다고 발표하였으며 이러한 양상은 CpG motif를 가진 ODN들을 세포에 처리하였을 때와 일치하는 결과를 보였다. 따라서 본 발명에서는 외부의 DNA를 인식하여 프로세싱시켜 CpG motif를 생성시킬 수 있는 새로운 형태의 엔도뉴클레아제가 면역세포에 존재할 수 있다는 가정 하에 여러 종류의 면역 세포주들을 사용한 실험에서 이와 같은 효소활성의 존재를 확인하였다.

1-1 세포배양 및 전처리

사람의 B-림프아 (IM9 및 RPMI1788) 세포주, T-림프아 (Molt-4 및 Jurkat) 세포주, 그리고 골수발생 (U937) 세포주는 American Type Culture Collection ([ATCC] Rockville, MD)에서 구입하였다. 세포는 열처리한 우태아혈청(FBS, Gibco BRL) 10%를 함유하는 RPMI1640 배지에서 1ml당 $4-5 \times 10^5$ 개의 세포수를 유지하면서 배양하였다. 세포배양은 37°C 에서 5% CO₂를 함유한 인큐베이터(Forma)에서 수행하였다. 세포수와 세포배양중 생존율은 혈구계를 이용하여 트리판 블루 배제(trypsin blue exclusion) 방법으로 주기적으로 측정 하였다. 모든 실험에서 세포의 생존율은 95% 이상을 유지시켰다. 세포내에서 엔도뉴클레아제가 생합성되는지를 확인하기

위하여 IM9 세포주에 액티노마이신 D (ACD, Sigma)를 0.33 ug/ml로 전처리 하였다 [Cooper H. L., and Braverman R. (1977) *Nature* 269, 527-529]. IM9 세포주를 ACD로 처리하여 30분간 배양한 후 세척하고 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배지에서 48시간 동안 배양하면서 일정한 시간 간격으로 엔도뉴클레아제 효소활성을 측정하였다.

그 결과 여러 종류의 면역반응에 관여하는 세포들의 세포배양액 과 세포용해물에서 엔도뉴클레아제 효소활성이 나타나는지를 분석하기 위하여 DNA-천연-PAGE 뉴클레아제 활성 검정을 수행하였다. 실험한 세포 배양액 중에서 분비된 엔도뉴클레아제 활성은 IM9 세포주에서만 관찰할 수 있었다(도 5B, 라인 2). 그러나, 사람의 T-림프아 세포주인 Molt-4 세포주 배양시 세포 용해물에서는 항상 엔도뉴클레아제 활성이 존재함을(도 5A, 라인 4) 확인할 수 있었으나 세포배양액에서는 관찰할 수 없었다. 골수발생 세포주인 U937 세포주, B-림프아 세포주인 RPMI1788 세포주, 그리고 T-림프아 세포주인 Jurkat 세포주에서는 이 엔도뉴클레아제의 효소활성을 세포배양액, 또는 세포 용해물에서 모두 관찰할 수 없었다. 또한, 도 4에 나타난 것처럼 세포내에서의 엔도뉴클레아제 생합성(도 4A)과 세포배양액으로의 분비(도 4B)는 ACD전처리 후 초기에 현저하게 줄어들었음을 관찰할 수 있었다. 이러한 실험 결과는 IM9 세포주에서 엔도뉴클레아제의 합성과 분비가 밀접하게 관계되어 있음을 보여준다.

면역반응에 관여하는 사이토카인이 엔도뉴클레아제 합성 및 분비에 어떤 영

향을 주는지를 확인하기 위하여 인터페론- γ (IFN- γ , 10 units/ml, Genetech Inc)와 인터루킨-1 β (IL-1 β , 10 units/ml, Genetech Inc.)를 처리하였다. 인터루킨을 포함하는 배지에서 24시간 동안 세포를 배양하면서 DNA-천연-PAGE로 분석한 결과, 도 6에서 나타난 바와 같이 이러한 사이토카인들은 엔도뉴클레아제 분비에 크게 영향을 미치지 않음을 볼 수 있었다. 또한, 미토겐인 LPS나 TPA도 엔도뉴클레아제의 분비에 아무런 영향을 미치지 않음이 관찰되었다.

단핵세포를 분화시키는 물질인 12-O-테트라데카노일포르볼 13-아세테이트 (TPA, Sigma)를 U937 세포에 서로 다른 농도에서 시간에 따라 처리하면서 엔도뉴클레아제의 합성 및 분비를 관찰하였다. 사이클로헥시미드(CHX, 10 mg/ml, Sigma)와 미토겐인 리포폴리삭카라이드(LPS, 1 ng/ml, Sigma)를 U937 세포에 처리하여 TPA를 처리한 세포와 비교하였다. 세포에 여러 물질들을 처리하였을 때 세포 모양을 관찰하기 위하여 세포를 포스페이트-완충된 염수 (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4)로 세척한 다음 세포원심분리 슬라이드 (cytocentrifuge slides)를 준비하고 Wright-Giemsa (Sigma)로 염색하여 확인하였다. 시험결과, U937과 같은 사람의 골수성 류케미아 세포주는 TPA 자극에 의해 분화되었을 때 세포 모양이 성숙된 형태를 나타내며 성장이 멈추게 되는 반면에 LPS 자극에 의해서는 세포증식이 일어나게 된다. 이와 같은 미토겐에 의한 세포의 성장 곡선을 그려보면 도 9에서와 같이 나타난다. 즉, U937 세포주가 TPA에 의해서 분화되어 세포의 모양이 변하면서 성장이 멈추었음을 알 수 있었고 LPS에 의해서는 세

포 증식이 일어남을 관찰할 수 있었다. 반면에 apoptosis를 유발하는 물질중 하나인 CHX를 처리하였을 때는 세포가 죽어가는 결과를 볼 수 있었다. 이와 같은 세포 배양 조건에서 엔도뉴클레아제가 생성되고 분비되는지를 관찰하기 위한 실험을 수행하였다. 도 10에서는 TPA 농도 증가에 따라 엔도뉴클레아제의 세포내 생합성이 증가함을(도 10A) 볼 수 있으며 동시에 효소가 세포 외부로 지속적으로 분비됨을 관찰할 수 있었다(도 10B). 엔도뉴클레아제 생합성은 10 pg/ml 의 TPA 농도에서부터 크게 증가됨을 볼 수 있었고(도 10A) 10 ng/ml의 TPA를 U937 세포배양액에 처리하고 일정한 시간 간격으로 엔도뉴클레아제 활성을 관찰하였을 때 도 11과 같은 결과가 나타났다. 엔도뉴클레아제 효소 활성은 TPA 처리 후 6 시간부터 합성되어 분비되기 시작하여 24시간 후에 합성 및 분비가 가장 많이 나타남을 볼 수 있다. 세포를 증식시키는 LPS를 1 ng/ml의 농도로 처리한 후 일정한 시간 간격으로 엔도뉴클레아제의 활성을 측정하였을 경우에는 도 12와 같은 결과를 관찰할 수 있었다. LPS처리 12시간 후부터 세포 용해물에 효소활성이 나타나기 시작하여 24시간 후에는 높은 효소 활성을 관찰할 수 있는 반면에 세포 배양액에서는 이와 같은 효소활성이 24시간 동안 전혀 관찰되지 않았다. Apoptosis를 유도하는 물질인 CHX를 U937 세포주에 처리했을 때 세포가 죽어가는 현상을 현미경으로 관찰할 수 있었고 이때 엔도뉴클레아제 생합성에는 전혀 영향을 미치지 않음을 볼 수 있었다(도 13, 라인 4). U937 세포주에서 TPA, LPS, 그리고 CHX를 처리하였을 때의 효소활성을 도 13에 요약하였다.

1-2 세포 용해물의 제조 및 DNA-천연-PAGE에서 엔도뉴클레아제 활성 측정

세포배양액은 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 세포는 차가운 PBS로 두 번 세척한 후 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA 와 1 mM PMSF를 함유하는 0.5% Nonidet P-40 (NP-40) 완충용액(용해 완충용액)에 1×10^7 개 세포/ml 되게 채부유시켰다. 4°C 에 15분간 방치하여 세포를 용해시킨 후 4°C 에서 15분 동안 12,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 세포 용해물로 사용하였다.

엔도뉴클레아제 활성을 측정하고 특성을 규명하기 위하여 변형된 천연 폴리 아크릴아미드 겔 검정 시스템을 사용하였다. Hoefer Tall Mighty Small (0.75 mm x 8 cm x 11 cm) 수직형 전기영동 장치를 이용하여, SDS가 없는 7% 폴리아크릴아미드 겔을 초나선형(supercoiled) 플라스미드 DNA(pGEM-T 벡터, 3.0 kb, Promega)를 최종농도 150 ug/ml 되게 공중합화시켰다. 세포배양액 또는 세포 용해물의 단백질 시료를 각 웰당 10 ug 씩 로딩한 후에 4°C에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후 겔을 증류수로 세 번 세척하고 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM CaCl_2 그리고 10 mM MgCl_2 (TCM buffer)로 구성된 반응 완충용액에서 37°C에서 4 시간 동안 흔들어 주면서 반응시켰다. DNA-천연-PAGE 상에서 엔도뉴클레아제의 반응 특이성을 규명하기 위하여 반응시간을 변화시켰을 때의 효소 활성을 관찰하였다. 반응시킨 겔은 37°C의 1 ug/ml의 에티듐 브로마이드를 함유하는 TCM 완충용액에서 30분 동안 염색하고

302 nm 트랜실루미네이터(transilluminator)로 사진을 찍었다. 겔에서 뉴클레아제 활성이 나타나는 위치는 오렌지색의 바탕에 검정색의 밴드로 관찰할 수 있었다. 엔도뉴클레아제 활성의 표준물질로 소 체장의 DNase I (RNase-없는 10-50 x 10³ units/ml, Boehringer Mannheim)를 사용하였다.

본 발명에서 고안한 DNA-천연-PAGE 뉴클레아제 검정 시스템에 의해서 세포배양액 과 세포용해물에서 효소활성을 민감성과 함께 선택적으로 측정할 수 있음을 보여주고 있다(도 1). 10 ug의 단백질을 함유하고 있는 세포배양액 과 세포 용해물에서 엔도뉴클레아제 활성이 나타나는 부위에 강한 활성띠를 관찰할 수 있었다. IM9 세포주의 배양시간에 따른 엔도뉴클레아제의 생합성 및 분비를 분석한 결과 도 1과 같다. 세포 용해물에서의 엔도뉴클레아제 효소활성 정도는 48시간 동안 배양할 경우 거의 일정하게 관찰되었으나(도 1A), 세포배양액에서는 같은 실험 조건에서 상당히 많은 엔도뉴클레아제 활성이 축적됨을(도 1B) 관찰할 수 있었다. 배양한 IM9 세포주를 여러 차례 PBS로 세척한 다음 혈청-없는 배지로 옮겨 배양했을 때, 도 1B에서 관찰되었던 주된 엔도뉴클레아제 활성띠는 그대로 관찰할 수 있었으나 DNase I 효소활성은 전혀 존재하지 않는 것으로 나타났다(도 1C). 이러한 결과에서 IM9 세포배양액 과 세포 용해물에서 관찰된 엔도뉴클레아제는 세포가 배양된 배지 성분인 FBS에서 유래된 것이 아니라 세포에서 합성되어 배지로 분비되었다는 것을 알 수 있다. 도 1B의 세포배양액중 전기영동 상에서 빠르게 이동한 약한 뉴클레아제 활성띠는 DNase I임을 Boehringer Mannheim에서 구입한 소의 DNase I 과 비

교하여 확인할 수 있었다(도 1D).

도 2에서는 DNA-천연-PAGE에서 서로 다른 반응용액의 조건에서 1 시간과 4시간 동안 효소활성을 측정한 결과이다. 10 mM Mg^{2+} 을 포함하는 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액에서 1시간 반응시켰을 때, 도 2A에서 나타나는 바와 같이 IM9 세포주에서 분비된 엔도뉴클레아제만 효소활성을 보였다. 그러나 동일 반응조건에서 반응시간을 연장하여 4시간 동안 반응시킨 결과(도 2B) 구입한 DNase I 과 함께 FBS에 존재하는 DNase I도 동일한 위치에서 효소활성을 나타냄이 관찰되었다. 이상과 같은 결과로부터 IM9 세포주에서 생성되고 분비되는 엔도뉴클레아제는 천연-PAGE상에서 DNase I과 서로 다른 이동거리를 보여 주었고, 주어진 반응조건에서 효소의 반응성도 각기 상이함을 확인하였다.

1-3 DNase I에 대한 항체생산 및 면역침강

면역전 혈청을 얻기 위하여 Sprague-Dawley (SD, 150-200 g) 쥐의 꼬리에서 혈액을 채취하였다. 소의 췌장 DNase I (Sigma)를 7% 천연-PAGE 상에서 DNase I에 해당하는 위치의 단백질 띠를 멸균한 PBS에서 작은 조각으로 잘라 면역하는데 이용하였다. SD 쥐에 단백질 100 ug을 표준 방법[Harlow, E., and Lane, D. (1988) Antibodies, A laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York]에 따라 면역하였다. 4회 접종하고 10일 후에 쥐에서 혈액을 채취하여 항체 역가와 특이성을 측정

하였다. DNase I을 함유하고 있는 혈청에서 안티-DNase I 항체를 ImmunoPure plus protein A/G IgG 정제 키트(Pierce) 와 소의 DNase I이 결합된 Sepharose-CL 4B를 이용하여 정제하였다. 정제한 안티-DNase I 항체 와 프로테인 A-Sepharose CL 4B를 결합한 비드로 50 ml 의 세포배양액 또는 PBS에 10배 희석한 사람 혈장 50 ml를 면역침강시켰다. 면역침강은 4°C에서 6시간동안 서서히 흔들어 주면서 수행하였다. 면역침강한 상층액을 취하여 DNA-천연-PAGE 상에서 엔도뉴클레아제 효소활성을 측정하였다.

도 3A는 제조한 항체가 FBS에서 유래한 DNase I을 인식함을 보여주고, 또한 사람 혈청에 존재하는 DNase I과 교차반응성을 가짐을 볼 수 있었다. 물론, 면역전 혈청은 FBS와 사람 혈청의 DNase I을 인식할 수 없었다. 이와 같이 제조된 DNase I 항체를 이용하여 분비되는 엔도뉴클레아제와 DNase I 각각에 대한 교차반응성을 분석하였다. IM9 세포주 배양액을 안티-DNase I 항체로 면역침강한 상층액에서는 빠르게 이동하는 DNase I 효소활성이 나타나지 않았으나, 분비된 엔도뉴클레아제의 효소 활성은 면역침강되지 않고 그대로 회수됨을(도 3B) 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로부터 IM9 세포주에서 분비된 엔도뉴클레아제는 DNase I과 면역학적으로 확연히 구분된다는 또 하나의 증거를 확보하였다.

1-4 엔도뉴클레아제 활성의 부분 정제 및 특성 규명

IM9 세포주의 배양액으로부터 엔도뉴클레아제를 부분 정제하기 위하여, 제조 실시예 1-2와 같이 전기영동한 후 효소활성이 있는 부위의 단백질을 용출하였다. 뉴클레아제 활성이 있는 부위의 단백질을 자르고 작게 조각을 내어 에펜도르프 마이크로튜브(eppendorf microtubes)에 옮긴 후 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충 용액으로 4°C에서 10 시간 동안 흔들려 주어 단백질 용출을 수행하였다. 이 시료를 4°C에서 14,000 rpm으로 10 분간 원심분리한 후 상층액을 20 μ l 씩 분주하여 실험에 이용하였다. 용출한 20 ng의 회수한 단백질 시료를 여러 농도의 양이온을 함유하는 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에서 초나선 플라스미드 DNA와 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 효소활성에 대한 pH의 효과를 측정하기 위해서는 서로 다른 pH의 1 mM CaCl_2 와 10 mM MgCl_2 를 함유하는 20 mM MOPS 완충용액에서 효소활성을 측정하였다. 반응시간에 따른 엔도뉴클레아제의 효소활성을 분석하기 위하여, 효소반응을 37°C에서 180분 동안 10 mM MgCl_2 를 함유하고 있는 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에서 일정한 시간 간격으로 관찰하였다. 반응은 DNA 시료 완충용액(30% 글리세롤, 0.5% 브로모페놀 블루, 그리고 0.5% 크실렌 사이놀)을 함유한 TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA) 완충용액을 첨가한 후에 얼음에 넣어 반응을 정지시켰다. 반응산물은 에티뒴 브로마이드(0.5 μ g/ml)을 함유하고 있는 1% 아가로즈 겔에서 전기영동을 수행하여 확인하였다.

분리된 효소가 최적 활성을 갖는 pH는 7.0으로 관찰 되었으나 비교적 넓은 범위의 pH에서 최대활성이 나타남을 관찰할 수 있었다(도 7). 20 mM Tris-HCl (pH

7.0) 완충용액에서 엔도뉴클레아제의 효소 활성은 Mg^{2+} 의존적이고, Ca^{2+} 에 의해서는 영향을 받지 않음을 알 수 있다(도 8A). 1-10 mM범위의 Ca^{2+} 농도 구간에서는 효소 활성이 발현되지 않았으나, Mg^{2+} 농도에 의존하여 효소활성에 의해 플라스미드로부터 선형 DNA가 형성됨을 볼 수 있었다. 이와 병행하여 엔도뉴클레아제의 반응시간에 따른 Mg^{2+} -의존적인 선형 DNA 형성을 관찰하였다. 초나선 플라스미드 DNA가 선형 DNA로 전환되는 반응은 10분 동안 반응시켰을 때 나타나기 시작하여 60분까지 점차 증가하였으며 이와 같은 실험 조건에서 뉴클레아제 활성은 180분 이상 지속되었다(도 8B). 따라서, 이 효소는 초나선 플라스미드 DNA를 선형 DNA로 전환시킨 후 계속해서 분해시킴을 알 수 있으며, 이러한 결과들로부터 IM9 면역세포가 분비하는 엔도뉴클레아제의 활성은 Mg^{2+} -의존성임을 확인하였다.

본 발명에서는 Mg^{2+} -의존성인 엔도뉴클레아제 활성이 IM9 세포주에서 일정한 양으로 생성되고 지속적으로 세포배양액으로 분비됨을 보여 주었다. 또한 이 엔도뉴클레아제는 FBS와 사람 혈청에 존재하는 DNase I과 다르다는 것을 천연-PAGE에서 이동거리의 차이와 안티-DNase I항체를 이용한 면역침강의 결과로 확인할 수 있었다. 지금까지 apoptosis 과정중 DNA 절단에 작용하는 것으로 보고되어 있는 엔도뉴클레아제와 비교하여 볼 때 효소활성의 양이온 의존도, 천연-PAGE에서의 이동거리 그리고 활성에 요구되는 최적 pH 등 여러 생화학적 특성에서 구분되는 차이점을 보여주고 있다. 또한 U937 세포주가 분화하면서 엔도뉴클레아제가 생성되고 분비된다는 사실로부터 면역반응에서 엔도뉴클레아제가 외부의 DNA를 인식하여 적절한 크기

로 분해할 수 있는 매우 중요한 생물학적 기능을 가지고 있음을 규명하였다. 즉, 세포밖으로 분비되는 엔도뉴클레아제가 외부 DNA에 대한 방어체계에 밀접한 관련성을 가지고 중요한 역할을 수행할 수 있다는 가정은 매우 흥미로운 것이다. 이러한 엔도뉴클레아제의 기능은 Stacey 등이 최근에 제시한 바와 같이 대식세포가 박테리아 DNA를 받아들인 결과 세포가 활성화된다는 연구 결과[Stacey, K. J. et al (1996) *J. Immunol.* 157, 2116-2122]와 Higashi 등이 밝힌 실험 결과[Higashi, N. et al (1993) *Cell. Immunol.* 150, 333-342]로서 단핵세포/대식세포에 의해 매개되는 세포독성이 뉴클레아제에 의해서 일어날 수 있다는 사실을 뒷받침하고 있다.

실시예 2

뉴클레오솜간 DNA 절단을 유도하는 Mg^{2+} -의존성 엔도뉴클레아제의 특성 확인

apoptosis는 염색질 응집, membrane blebbing, 그리고 엔도뉴클레아제의 작용에 의해 여러 종류의 뉴클레오솜 크기로 염색질의 절단이 일어나는 세포사멸의 특징적인 형태로 정의된다[Wyllie, A. H. et al (1984) *J. Pathol.* 142, 67-77; Wyllie, A. H. (1980) *Nature* 284, 555-556; 및 Kerr, J. F. R. et al (1972) *Br. J. Cancer.* 26, 239-257]. 엔도뉴클레아제의 활성화는 apoptosis 과정의 중요한 부분을 차지하며[Arends, M. J., and Wyllie, A. H. (1990) *Am. J. Pathol.* 136, 593-608], 많은 연구자들에 의해 여러 종류의 뉴클레오솜 절단에 관여하는 효소들이 제안되었다. DNA의 뉴클레오솜간 절단에 관여하는 효소로는 DNase I[Peitsch M.

C. et al (1993) *EMBO J.* 12, 371-377], DNase II[Torriglia A. et al (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 28579-28585; 및 Barry M. A., and Eastman A. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 440-450], 그리고 NUC-18[Kawabata, H. et al (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 133-138]이 작용할 것이라고 제안되었다. 또한, 많은 연구자들은 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -의존성[Stratling W. H. et al (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5893-5898; Pandey S. et al (1997) *Biochemistry* 36, 711-720; 및 Ribeiro J. M., and Carson D. A. (1993) *Biochemistry* 32, 9129-9136] 또는 Mg^{2+} -의존성의[Anzai N. et al (1995) *Blood* 86, 917-923; Kawabata H. et al (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 247-254; Sun X. M., and Cohen G. M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 14857-14860; 및 Kawabata, H. et al (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 133-138] 엔도뉴클레아제가 여러 종류의 조직과 세포들에서 뉴클레오솜간 DNA를 절단할 수 있다고 제안하였다. 그러나, 여러 종류의 다른 엔도뉴클레아제들이 서로 다른 세포체계에 관련되어 있는지 또는 모든 종류의 세포에서 세포의 사멸이 활발하게 일어날 때 염색질 절단을 유도하는 알려지지 않은 효소가 존재하는지는 아직까지 명확한 증거가 제시되지 않고 있다. 따라서 apoptosis에 작용하는 엔도뉴클레아제를 확인하고 효소가 활성화되는 정확한 메커니즘을 규명하는 연구가 최근 들어 지대한 관심의 대상이 되고 있다.

제조실시예1에서는 DNA-천연-PAGE를 이용하여 사람의 B-림프아 IM9 세포주가 엔도뉴클레아제를 합성하고 세포배양액으로 분비함을 밝혀내었다. 그리고 이 효소

가 지금까지 규명된 다른 엔도뉴클레아제들과 천연-PAGE에서의 이동거리, 최적 효소활성을 나타내는 pH, 효소활성을 위해 요구되는 2가 이온등의 특성이 서로 다르다는 것을 보여 주었다.

본 발명에서는 제조실시에1 에서 밝힌 세포배양액 및 세포 용해물에 존재하는 엔도뉴클레아제와 동일한 것으로 추정되는 효소활성이 세포의 핵에도 존재함을 밝혔으며 apoptosis 과정중 이 효소가 핵에 축적됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 엔도뉴클레아제가 핵에 작용하여 뉴클레오솜 절단을 유도한다는 사실은 아마도 사멸에 이르도록 되어 있는 세포를 없앤다는 의미에서 방어 작용이라 말할 수 있을 것이다. IM9 세포주에 CHX를 처리하였을 때 apoptosis의 생화학적 현상의 정점으로 알려진 DNA의 올리고뉴클레오솜 절편형성을 아가로즈 겔 전기영동에서 확인할 수 있었다. IM9 세포주에서 분리한 핵을 Mg^{2+} 존재하에서 반응시켰을 때도 전형적인 DNA 절단을 볼 수 있었다. 자가분해에 의한 DNA 절단은 명확하게 Mg^{2+} -의존성이고 Ca^{2+} -비의존성임을 확인할 수 있었다. 또한 핵에 존재하는 엔도뉴클레아제 효소활성을 DNA-천연-PAGE 검정 시스템에서 관찰할 수 있었다. 이 효소의 활성을 위한 최적 pH 역시 6.5-7.5로 밝혀졌다. 이와 같은 결과는 제조실시에1에서 밝힌 IM9 세포주에 의해 합성되고 분비되는 엔도뉴클레아제와 핵에 존재하는 효소가 동일함을 입증하는 실험적 증거로 제시될 수 있다. 또한 IM9 세포의 핵에 존재하는 이 엔도뉴클레아제는 많은 연구자들에 의해 여러 조직과 세포들에 존재하는 것으로 알려진 Mg^{2+} -의존성 엔도뉴클레아제[Anzai N. et al (1995) *Blood* 86, 917-923; Kawabata

H. et al (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 247-254; Sun X. M., and Cohen G. M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 14857-14860; 및 Kawabata, H. et al (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 133-138]와 깊은 관계가 있을 것으로 추정된다. 그러나 아직까지 apoptosis에 관여하는 엔도뉴클레아제를 보고한 연구 결과에서 Mg^{2+} -의존성 엔도뉴클레아제를 전기영동 분석에서 단백질띠나 효소활성띠로 규명한 연구자는 없었다.

본 발명에서 관찰한 엔도뉴클레아제는 지금까지 밝혀진 DNA의 뉴클레오솜간 절단에 관여하는 효소인 Ca^{2+}/Mg^{2+} -의존성 엔도뉴클레아제[Stratling W. H. et al (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5893-5898; Pandey S. et al (1997) *Biochemistry* 36, 711-720; 및 Ribeiro J. M., and Carson D. A. (1993) *Biochemistry* 32, 9129-9136], DNase I[Peitsch M. C. et al (1993) *EMBO J.* 12, 371-377], DNase II[Torriglia A. et al (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 28579-28585; 및 Barry M. A., and Eastman A. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 440-450], NUC-18[Kawabata, H. et al (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 133-138]들과 칼슘 의존성, 천연-PAGE에서의 이동거리 차이, 그리고 최적활성 pH 면에서 구분될 수 있다. 본 발명에서 밝힌 Mg^{2+} -의존성 엔도뉴클레아제의 생리적인 중요성은 명확하게 규명되지 않았으나, apoptosis 과정중 세포의 핵에서도 관찰된다는 사실로부터 apoptosis 과정에서 중요한 역할을 수행할 것으로 추정할 수 있다. 따라서 엔도뉴클레아제의 활성화 메카니즘과 명확한 기능을 효소학적 측면에서 밝힌다면 apoptosis 과정을 이

해하는 데에 유용한 정보를 제공할 수 있다.

2-1 Apoptosis 유도

사람 B-림프아 (IM9) 세포주를 배양한 다음에 apoptosis는 10 ug/ml의 CHX(Sigma)를 처리하고 24 시간동안 배양하여 유도하였다[Chow, S. C. et al, (1995) *Exp. Cell. Res.* 216, 149-159]. CHX에 의해 apoptosis가 유도된 세포의 모양 변화는 세포원심분리 슬라이드를 준비한 후 Wright-Giemsa (Sigma)로 염색하여 확인하였다.

도 15A에서 CHX(10 ug/ml)를 IM9 세포주에 24 시간 동안 처리하였을 때 특징적인 뉴클레오솜간 DNA 절단의 형태인 DNA 조각 형성을 볼 수 있었다. CHX의 효과는 12시간 후부터 나타나기 시작하여 24 시간 후에는 많은 양의 DNA 조각이 형성되는 현상을 관찰하였다. Apoptosis에 의해 세포가 죽을 때 일어나는 세포의 형태를 관찰하기 위하여 Wright-Giemsa로 염색해 본 결과는 도 15C와 같다. CHX를 처리한 세포에서는 apoptosis가 일어나는 세포가 많이 존재하였으며, 세포가 쭈그러지고 염색질이 모여서 핵이 조각나는 특징적인 세포모양 변화가(도 15C) 정상적으로 성장하는 세포(도 15B)와 비교되었다.

2-2 CHX를 처리한 IM9 세포주의 엔도뉴클레아제에 의한 DNA 절단 확인

IM9 세포주를 5×10^5 개 세포/ml의 세포수로 배양하면서 10 ug/ml 의 CHX(Sigma)를 처리하고 24 시간 동안 배양하면서 일정한 시간 간격으로 1×10^6 개의 세포를 취하여 Blin 과 Stafford의 방법[Blin, N., and Stafford, D. W. (1976) *Nucleic Acids Res.* 3, 2303-2308]을 변형한 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 1×10^6 개의 세포를 PBS로 2회 세척하고 TE 완충용액으로 재부유시킨 후 DNA 추출 완충용액(10 mM Tris-HCl , pH 7.6, 10 mM EDTA , 100 mM NaCl , $0.2\% \text{ SDS}$, 그리고 100 ug/ml 프로테이나제 K) 1 ml 을 첨가하여 50°C 에서 8 시간 동안 반응시킨 후 시료를 페놀/클로로포름으로 2회 처리하여 단백질을 제거하고 0.3 M 아세트산 나트륨(pH 5.2)를 첨가한 다음 차가운 에탄올로 침전시켰다. 이 침전물을 TE (10 mM Tris-HCl , pH7.6, 1 mM EDTA) 완충용액으로 녹인 후 RNase A를 처리하고 1.8% 아가로즈 겔에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동한 겔을 0.5 ug/ml 의 에티뮴 브로마이드가 들어 있는 용액에 30분 동안 방치한 후 UV에서 사진을 찍었다.

CHX를 처리한 IM9 세포를 일정한 시간 간격으로 취하여 세포 용해물과 핵을 준비하고 용해시킨 다음, 핵에 존재하는 엔도뉴클레아제의 효소활성을 확인하기 위하여 DNA-천연-PAGE 뉴클레아제 활성 겔 검정을 수행하였다. 도 16A의 결과에서 IM9 세포주를 24시간 동안 배양할 때 세포 용해물에 엔도뉴클레아제 효소활성이 일정하게 나타남을 볼 수 있다. 그러나 CHX를 처리한 세포의 세포 용해물에서는 6-12 시간 동안 효소 활성이 감소함을 볼 수 있고(도 16B), 반면에 그 핵에서는 효소활

성이 축적되는(도 16C) 현상을 관찰하였다.

2-3 세포핵의 분리 및 자가분해

세포의 핵을 분리하기 위해 1×10^7 개의 세포를 차가운 PBS로 3회 세척한 다음 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM $MgCl_2$ 그리고 0.9 M 수크로스를 포함하는 차가운 완충용액 0.5 ml로 4°C에서 20분 동안 용해시켰다. 준비된 세포 용해물을 1.2 M 수크로즈 용액 0.5 ml 위에 올려놓고 800 x g에서 40분 동안 원심분리하였다. 침전물에 존재하는 핵을 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액으로 현탁하여 얻었다.

분리한 핵의 자가분해는 Mg^{2+} 와 Ca^{2+} 의 농도를 변화시키면서 37°C에서 일정한 시간 간격으로 반응시켜 수행하였다. 반응은 10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS 그리고 프로테이나제 K를 포함하는 DNA 추출 완충용액 0.5 ml을 넣어 종결시켰다. 이 혼합물을 50°C에서 3 시간 동안 반응시킨 후 시료를 페놀/클로로포름으로 2회 처리하여 단백질을 제거하고 0.3 M 아세트산 나트륨(pH 5.2)를 첨가한 다음 차가운 에탄올로 침전시켰다. 이 침전물을 TE 완충용액으로 녹인 후 RNase A를 처리하고 1.8% 아가로스 겔에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동한 겔을 0.5 ug/ml의 에티뮴 브로마이드가 들어 있는 용액에 30분 동안 방치한 후 UV에서 사진을 찍었다.

분리한 세포의 핵을 자가분해시키는 방법을 이용하여 IM9 세포주의 핵에 존재하는 엔도뉴클레아제 효소활성을 측정한 결과 Mg^{2+} 농도(1 mM, 10 mM)에 의존적으로 DNA의 조각들이 생성되는 현상을 관찰하였다. 그러나 동일한 실험 조건에서 Mg^{2+} 을 Ca^{2+} 로 대체하였을 경우에는 이와 같은 DNA 절단이 관찰되지 않았으며 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 같이 존재하는 조건에서는 Mg^{2+} 만 존재할 때와 같은 유형으로 DNA 조각 형성이 나타났다(도 14A). 즉, Mg^{2+} 의 농도에 의존하는 엔도뉴클레아제 효소활성에 의하여 DNA가 분해되는 결과로 해석할 수 있다. 1 mM Zn^{2+} 와 5 mM EDTA 존재하에서는 핵에서 DNA 조각 형성이 일어나지 않았으며(도 14B) Mg^{2+} (10 mM)와 Ca^{2+} (10 mM)의 고정된 농도 조건에서 0-4시간 동안 DNA 조각 형성을 관찰한 결과, Mg^{2+} 단독으로 존재할 때는 반응 30분 후부터 DNA조각 형성이 시작되었으며 60-240분 동안에는 절단된 DNA 조각이 축적됨을 관찰하였다(도 14C). 그러나 Ca^{2+} 존재시는 4시간 동안에 DNA 조각 형성이 관찰되지 않았다(도 14D). 이상과 같은 실험 결과를 통하여 IM9 세포핵에 존재하는 엔도뉴클레아제 활성에는 DNA 조각 형성을 위해 Mg^{2+} 이 절대적으로 요구됨을 확인하였다.

2-4 세포의 핵에 존재하는 엔도뉴클레아제의 부분 정제 및 특성 연구

세포의 핵에 존재하는 엔도뉴클레아제의 부분 정제는 핵을 용해시킨 후 제조 실시예 1-4의 방법으로 활성이 있는 부위의 단백질을 용출하여 수행하였다. 초나선 플라스미드 DNA를 기질로 이용하여 효소 활성을 측정하면서 제조실시예 1-4의

방법으로 2가 이온 의존성을 관찰하였다. 또한, apoptosis의 저해물질로 알려진 $ZnCl_2$ 와 킬레이트화제인 EDTA를 처리하였을 때 효소활성의 변화도 관찰하였다.

DNA-천연-PAGE에서 확인한 IM9 세포의 핵에 존재하는 엔도뉴클레아제 효소활성의 특성을 규명하기 위하여 효소를 천연-PAGE로 분리하여 용출하였다. 엔도뉴클레아제의 양이온-의존성을 관찰한 결과 세포배양액에 존재하는 효소와 같이 Mg^{2+} -의존성임을 확인하였다(도 17). Apoptosis 저해물질인 Zn^{2+} 와 킬레이트화제인 EDTA에 의해서는 엔도뉴클레아제 효소활성이 완전히 저해됨을 볼 수 있다. 이러한 결과들로부터 초나선 플라스미드 DNA가 선형 DNA로 전환되는데 Mg^{2+} 가 요구됨을 알 수 있으며 이는 도 8에서 밝힌 결과와 일치하는 것으로 해석할 수 있다.

실시예 3

면역세포에서 외부 DNA에 대한 엔도뉴클레아제 작용 및 반응산물의 특성 규명

지금까지 외부물질로 인식되는 박테리아 DNA는 포유동물의 DNA에는 존재하지 않는 여러 가지 구조 결정인자가 존재한다고 밝혀져있으며, 이 인자가 면역세포를 활성화시킨다고 알려졌다[Gilkeson, G. S. et al (1995) *J. Clin. Invest.* 95, 1398-1402; Gilkeson, G. S. et al (1991) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 59, 288-300; Messina, J. P. et al (1993) *Cell. Immunol.* 147, 148-157; Krieg, A. M. et al (1995) *Nature* 374, 546-549; 및 Halpern, M. D. et al (1996) *Cell.*

Immunol. 167, 72-78]. 포유동물과 박테리아 DNA의 특징적인 차이점 중 하나는 포유동물은 상당한 CpG 억제와 CpG 디뉴클레오타이드의 사이토신(cytosine)에 선택적으로 메틸화되어 있다는 사실이다[Bird, A. P. (1995) *Trends Genet.* 11, 94-100; Razin, A., and Friedman, J. (1981) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 25, 33-52; 및 Han, J. et al (1994) *Antisense Res. Dev.* 4, 53-65]. 최근에 연구자들은 박테리아 DNA에 존재하는 CpG motif가 폴리클로날 B 세포를 빠르게 활성화시켜 IgM 분비를 촉진하며[Krieg, A. M. et al (1995) *Nature* 374, 546-549; Liang, H. et al (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 1119-1129; 및 Yi, A.-K. et al (1996) *J. Immunol.* 156, 558-564], 안티-IgM 항체에 의해 세포주기가 멈추게 되고, 박테리아의 CpG motif는 apoptosis가 일어나는 B 세포의 *c-myc* 발현을 저해하며 *myn*, *blc2*, 그리고 *bcl-X_L* mRNA 발현을 증가시켜 apoptosis로부터 세포를 보호해준다고 제안하였다[Yi, A.-K. et al (1996) *J. Immunol.* 157, 4918-4925]. 또 다른 연구에서는 CpG motif가 직접 B 세포를 활성화시켜 짧은 시간 안에 IL-6 와 IL-12 분비를 촉진시킨다고 보고하였다[Halpern, M. D. et al (1996) *Cell. Immunol.* 167, 72-78; Yi, A.-K. et al (1996) *J. Immunol.* 157, 5394-5402; 및 Klinman, D. M. et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2879-2883]. 또한 CpG motif는 NK 세포에 작용하여 약하게 CD4⁺ 세포에서 IFN- γ 를 유도하는 것으로 밝혀졌다[Bird, A. P. (1995) *Trends Genet.* 11, 94-100; 및 Yamamoto, S. et al (1992) *Microbiol. Immunol.* 36, 983-997]. 따라서 CpG DNA에 의한 면역세포의 활성화는 IL-6의 유도에 의해 체액성 면역을 증가시키고 IFN- γ 의 분비로 세포성 면역이 증가된다. 또한

박테리아 DNA를 대식세포가 소화하면서 활성화되어 $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, 그리고 플라스미노젠 활성화제 억제제-2 mRNA 생성을 유발 시킨다고 알려졌다[Stacey, K. J. et al (1996) *J. Immunol.* 157, 2116-2122].

본 발명에서는 면역세포에서 박테리아 DNA를 인식하여 분해시키는 역할을 수행하는 엔도뉴클레아제의 효소활성 특성 및 효소반응 최종산물의 특성을 규명하였다. 또한 세포배양액에서 적절하게 프로세싱된 DNA 조각이 세포에 유입되어 세포내에서 엔도뉴클레아제의 작용에 의해 프로세싱됨을 확인하였다. 면역세포내로 유입된 외부의 DNA는 세포내에서 엔도뉴클레아제의 작용에 의해 최종적으로 약 10개 염기의 일본쇄 조각으로 분해됨을 확인하였고, 엔도뉴클레아제에 의해서 세포내에서 분해된 DNA 조각에는 5'-말단에 두개의 퓨린 염기 그리고 3'-말단에 두 개의 피리미딘 염기로 구성된 CpG motif가 존재함을 규명하였다. 또한 CpG motif가 존재하는 올리고뉴클레오타이드나 PCR로 증폭된 DNA의 자극에 의해 B 세포인 IM9 세포주가 IgM을 분비함을 관찰할 수 있었다. 그러나 CpG motif가 메틸화된 DNA나 진핵세포의 DNA에 의해서는 IgM의 분비가 촉진 되지 않음을 아울러 확인하였다. 이러한 결과들은 CpG motif가 B 세포와 대식세포 등에 작용하여 IgM과 사이토카인의 분비를 촉진시킨다는 기존의 연구 결과와도 일치하였다. 그러나 박테리아 DNA를 분해하여 CpG motif를 생성하는 과정과 이에 수반되는 효소에 대하여는 본 발명에서 최초로 규명하였다.

3-1 엔도뉴클레아제에 의한 박테리아 DNA 프로세싱

엔도뉴클레아제의 효소활성 특이성과 최종 반응산물의 특성을 연구하기 위한 효소원으로 IM9 세포주의 배양액을 이용하였다. IM9 세포주를 10% FBS를 함유하는 RPMI1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 배양하여 효소원으로 사용하였다. 또한 DNase I이 없는 IM9 세포주에서 분비된 엔도뉴클레아제만 존재하는 효소원은 FBS가 없는 배지에서 세포를 36 시간 배양하여 세포배양액을 이용하였다.

효소의 기질로 사용한 플라스미드(pGEM-T 벡터, 3.0 kb)는 대장균에서 알카리 용해방법[Birboim, H. C., and Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523]으로 파쇄, 페놀/클로로포름으로 2회 추출한 후, 에탄올 침전반응을 수행하여 획득하였다. 대장균의 게놈성 DNA 와 IM9 세포의 DNA는 Blin 과 Stafford의 방법[Blin, N., and Stafford, D. W. (1976) *Nucleic Acids Res.* 3, 2303-2308]을 변형한 방법에 따라 추출하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후 TE 완충용액으로 재부유시킨 후 DNA 추출 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.2% SDS, 20 ug/ml RNase A)을 첨가하여 37°C에서 10분간 처리한 뒤 프로테이나제 K를 100 ug/ml 되게 첨가하여 50°C에서 8시간 반응시켰다. 이 반응액을 페놀/클로로포름으로 3회 추출하여 단백질을 제거한 후 에탄올 침전반응을 통하여 게놈성 DNA를 얻었다. 연어 정자 DNA도 상기와 같은 방법으로 추출하여 사용하였다. DNA에 존재하는 LPS의 양은 *Limulus* amebocyte 용해물 검정[Sullivan, J. D. et al (1976)

In *Mechanisms in Bacterial Toxicology*, A. W. Bernheimer, ed. Wiley, New York, p. 217] 방법에 의해 결정하여 2.5 ng/ml 이하임을 확인하였다..

10% FBS를 함유한 배지와 FBS가 없는 배지에서 배양한 IM9 세포배양액에서의 효소활성을 비교하기 위하여 100 ng의 플라스미드 DNA에 배양액을 20 μ l를 혼합한 후 37°C에서 일정한 시간 간격으로 반응시켰다. 이후의 세포배양액을 이용한 엔도뉴클레아제 활성 측정은 FBS에 존재하는 DNase I의 효과를 배제하기 위하여 FBS가 없는 배지에서 배양한 세포 배양액을 이용하였다. 또한 DNA 종류에 대해 엔도뉴클레아제의 반응성이 차이 나는지를 관찰하기 위하여 대장균, IM9 세포주, 그리고 연어 정자 게놈성 DNA 100 ng에 대하여 위와 같은 조건에서 반응시켜 효소활성을 1% 아가로즈 겔 전기영동상에서 확인하였다.

일차로 10% FBS를 함유한 RPMI1640배지 및 IM9 세포배양액을 직접 취하여 각각 박테리아의 DNA를 분해시키는 정도를 생체의외(in vitro) 반응으로 관찰하였다. 도 18A의 결과에서는 10% FBS를 함유하는 RPMI1640배지에서 플라스미드 DNA의 분해 정도를 나타내고 있다. 이 결과는 도 1D에서 나타난 결과와 다르게 배지에 DNase I이 존재하는 데도 효소활성이 크게 나타나지 않음을 보여주었다. 이는 배지의 조성이 DNase I활성에 영향을 줄 수 있는 이온이나 저해물질을 포함하는 것으로 생각할 수 있다. 반면에 세포배양 후 FBS가 없는 배양액과 10% FBS 함유 배양액에서는 플라스미드 DNA가 반응시간에 따라 분해됨을 볼 수 있었다(도 18B 및 18C). 즉, IM9

세포주에 의하여 분비된 엔도뉴클레아제에 의하여 플라스미드 DNA가 분해됨을 알 수 있는데, 도 18B 와 18C를 비교해보면 10% FBS를 함유한 배지에서의 세포 배양액에서 효소활성이 더 높게 나타남을 지적할 수 있다. 이는 세포수를 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 로 동일하게 세포배양을 시작했어도 FBS를 함유한 조건에서 세포의 성장이 활발하게 일어나고 엔도뉴클레아제도 많이 분비됨을 알 수 있다. 또한 세포배양액에 존재하는 엔도뉴클레아제의 작용이 서로 다른 종의 DNA에 어떻게 작용하는지를 시험한 결과는 도 19에서 볼 수 있듯이 대장균 DNA, 진핵세포인 IM9 세포주 DNA, 그리고 연어 정자 DNA 모두를 엔도뉴클레아제가 분해하는 것으로 나타났다.

3-2 박테리아 DNA의 세포내 유입 및 DNA 염기서열 분석

열처리한 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배지와 IM9 세포주를 48시간 배양한 세포배양액을 1:1로 혼합한 배지에서 IM9 세포주를 배양하였다. 박테리아 DNA (25 ug/ml)를 준비한 배양액에 넣어주고 IM9 세포주를 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 세포수로 배양하면서 일정한 시간 간격으로 세포를 취하여 세포에 유입된 DNA를 추출하였다.

박테리아 DNA를 IM9 세포주에 처리한 후 일정한 시간 간격으로 세포를 취하여 PBS로 3회 세척하였다. 이 세포를 차가운 용해 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 그리고 0.5% NP-40)에 채부유시킨 후 제조실시에 1-2의 방법에 따라서 세포 용해물을 얻었다. 세포 용해물에 DNA 추출 완

충용액을 동등한 부피로 첨가하여 42°C에서 3시간 동안 방치한 후 페놀/클로로포름을 2회 처리하여 단백질을 제거시키고 에탄올로 침전시켜 세포 용해물에 존재하는 DNA를 추출하였다. 침전물을 TE 완충용액으로 녹인 후 RNase A를 처리하여 써던 블롯팅(southern blotting)의 시료로 이용하였다.

세포 용해물에서 추출한 DNA를 1.8% 아가로스 겔에서 전기영동한 후 써던 이동을 실시하였다. 전기영동한 아가로스 겔을 알칼리 용액(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)200 ml정도에 20분 동안 흔들어 주고 증류수로 씻은 후, 중성화 용액(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH7.5)200 ml 정도에 20분 동안 방치한 후 다른 중성화 용액에 담그어 흔들어 주었다. 20X SSC 용액 (175.3 g의 NaCl, 88.2 g의 나트륨 시트레이트 그리고 0.5 M EDTA를 2 ml 넣고 증류수를 첨가하여 1 l 되게한 후 121°C에서 멸균하여 사용)이 담긴 용기에 또 다른 네모진 용기를 거꾸로 뒤집어 놓아 용액의 수면 위로 바닥이 올라와 있게 하였다. 그 바닥 위에 20X SSC로 포화된 폭이 2 mm 정도 큰 Whatman No.3 페이퍼를 공기방울이 없게 올려놓아 양쪽의 20X SSC를 연결시켰다. 페이퍼위에 아가로스 겔을 뒤집어 올려놓고, Hybond⁺ 나일론 막을 공기방울이 생기지 않게 올려놓았다. Hybond⁺ 나일론 막위에 4번 모두가 아가로스 겔보다 2 mm작은 Whatman No.3 페이퍼 3장을 공기방울이 생기지 않게 올려놓은 후, 종이타올을 그 위에 10-20 cm 높이로 쌓고 약 500g 정도의 무게를 위에 올려 놓았다. 파라필름을 겔 주변의 바닥을 두르고 모세관 이동을 8시간 동안 수행하였다. DNA가 이동된 막은 UV를 120,000 uJ/cm의 에너지로 2분 동안 쬔어 주어서 UV-가교시켰다.

박테리아 DNA를 엔도뉴클레아제로 37°C에서 30분간 반응하여 생성된 100-200 bp의 반응 생성물을 1% 아가로즈 겔 전기영동 후에 진 클린 키트(Gene Clean Kit, Promega, Inc.)로 gel에서 DNA를 회수하여 DNA 탐침으로 이용하였다. 이 DNA 50-100 ng을 100°C 물에서 3분 동안 끓이고 급속히 얼음에 식혀 DNA 가닥을 분리시킨 후 ^{32}P 로 표지하였다. DNA 표지 반응은 랜덤 프라이머 10 ng, 4 μl 의 완충용액 (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 5 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 0.5 mM HEPES, pH 6.6), 25 μM dATP, 25 μM dGTP, 25 μM dTTP, 60 μCi [α - ^{32}P] dCTP, 그리고 클레노우 효소 5 unit를 넣은 혼합액 20 μl 를 37°C에서 2 시간동안 반응시키는 랜덤 프라이밍 방법을 이용하였다. 여기에 0.5 M EDTA 2 μl 를 넣어 반응을 정지시킨 다음 같은 부피의 3 M 아세트산 나트륨 (pH 5.2), 보조첨가제로 20 μg 의 연어 정자 DNA를 넣고 2배 부피의 에탄올을 첨가하여 침전시켰다. 이 침전물을 TE 완충용액으로 녹인 후 100°C에서 끓이고 얼음속에서 급속히 냉각시켰다.

UV-가교시킨 Hybond⁺ 나일론 막을 68°C로 미리 중탕시킨 예비하이브리드화 용액(6X SSC, 5X Denhardt's 용액, 0.05% 피로인산나트륨, 0.5% SDS, 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 연어 정자 DNA)에 넣고 68°C에서 최소한 1시간 이상 흔들여 주었다. 그 후 얼음에서 식힌 랜덤 프라이밍 방법에 의해 준비된 표지된 탐침을 넣고 12시간 정도 하이브리드화시켰다. 이 필터를 세척용액 I (2X SSC, 0.1% SDS)에 옮긴 다음 상온에서 10분 정도 씻어주었다. 68°C에서 미리 중탕시킨 세척용액 I로 필터를 옮겨 25

분 정도 흔들면서 씻어주고, 역시 68°C에서 미리 중탕시킨 세척용액 II(0.2X SSC, 0.1% SDS)로 옮겨 Geiger 계수기로 측정하여 방사능이 감지되는 정도를 측정하면서 씻어 주었다. 이 필터를 X-선 필름과 함께 intensifying screen이 포함되어 있는 카세트에 넣고 -70°C에서 12-24 시간 방치한 다음 현상하였다.

박테리아 DNA 또는 플라스미드 DNA를 세포 배양시 넣어 주고서 1시간 동안 37°C 에서 배양한 후 세포 용해물에 존재하는 DNA 조각을 1.8% 아가로즈 겔 전기영동 후, 써던 이동에 의해서 확인된 50-200 bp위치에 해당하는 겔을 진 클린 키트 (Promega Inc.)로 회수하였다. 이 DNA조각들을 도 21에서와 같은 방법으로 pGEM-T 벡터 (Promega Inc.)에 넣어 대장균에서 클로닝하여 Sanger의 디데옥시리보뉴클레오타이드 쇠 종결방법[Sanger, F. et al (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467]을 시퀀나제(Sequenase) TM 버전 2.0 DNA 서열분석 키트(USB)를 사용하여 염기서열을 확인하였다. 서열분석 프라이머는 하기 표 1에 나타낸 M13 전방/역전 프라이머를 이용하였다. 클로닝된 DNA 서열을 BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) 프로그램을 이용하여 박테리아 또는 플라스미드 DNA의 잘려진 조각임을 확인하였다.

【표 1】

	올리고뉴클레오타이드	이용
A	TTAAAACGTTTCAC	CpG motif
B	AAGTGAACGTTTT	CpG motif
C	AGCAGCGCTAA	CpG motif
D	AATTAGCGCTG	CpG motif
E	CTCCCGGCCGCCATG	PCR 프라이머
F	TTGGGAGCTCTCCC	PCR 프라이머
G	GTTTTCCCAGTCACGAC	서열분석(pUC/M13 전방)
H	CAGGAAACAGCTATGAC	서열분석(pUC/M13 역전)

시험결과 25 ug/ml의 박테리아 DNA와 함께 IM9 세포를 배양했을 때, 세포 배양액에서 DNA가 적절하게 프로세싱되어 세포내로 유입됨을 써던 하이브리드화를 통하여 확인하였다(도 20). 세포배양 30분 후부터 100-200 bp의 DNA 유입을 관찰하였으며 배양 시간에 따라 세포내에서 100-200 bp의 DNA의 양이 감소함을 볼 수 있었다. 이 결과로부터 IM9 세포주는 외부에서 적절하게 프로세싱시킨 DNA를 세포내로 유입하게 되며 세포내에서 프로세싱을 지속적으로 진행함을 암시한다.

또한 엔도뉴클레아제 효소활성에 의한 생성물의 특성을 규명하기 위하여 세포내에 유입된 박테리아의 DNA를 추출하여 도 21에 설명된 방법으로 DNA 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석 결과는 하기 표 2에 제시된 바와 같이 특징적인 염기서열로 5' 쪽에 두개의 퓨린 염기와 3' 쪽에 두개의 피리미딘 염기가 존재하는 CpG motif가 엔도뉴클레아제 반응 생성물에 나타난 것을 볼 수 있다. 특징적인 CpG motif는 면역체계에서 B 세포 또는 대식세포를 활성화시켜 사이토카인과 IgM 분비

를 촉진시키는 것으로 알려져 있으며 박테리아 DNA에 높은 빈도로 나타나는 것으로 알려져 있다. 이 결과로부터 IM9 세포배양액의 엔도뉴클레아제 및 세포내에서의 효소활성에 의한 DNA 프로세싱이 면역세포를 활성화시키는 역할을 수행하는 CpG motif를 생성한다는 새로운 사실을 밝혀내었다.

【표 2】

세포에서 엔도뉴클레아제 반응에 의해 생성된 50 내지 200 bp DNA 절편

서 열	
EC1AGAGCAGCGCTAATGTCTATCGATGATTT...GTCAAAACGTTACCA.....
EC2TTAACAAACGTTGGGGCGATTGAGAGCGATGGCGTTGATTTCATGTAAACGAAGCTA ACGTGGTGAAAAACGATGATGGCGCACGCGAGAAAT.....
EC3CCCATGACGCACCGCA.....ATTCCATCGCCATCTCAAACCTTGGTAA
EC4	TGCCTCGGAGTTACCTAATTCCATCGCCATCTCAAACCTTGGTAAA
EC5CCTTTGACGTTGAGTCCACGTTCTTTA..... CCTATCTCGGTCTAT T.....
EC6	TTTACGGTTCCTG.....TTTCCTGCGTTATGCC.....
EC7	GTGACCATATGGGAGAGCTCC...ACGCGTTGGATG..... AGCTTGCGGTA ATCAT.....
EC8TTTCCTGCGTTATCCC.....GCTGATACGCTCGCCGACG CGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCG
PD1	CTTCTCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCGCTGCGGCGACCGTATCAG.....
PD2GGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGG.....
PD3TAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGA TGGCCC.....
PD4TTCCCAACGATCAAGGGCGAGTTACA.....CTCCGATCGTTGTCA G.....
EC9TGCTGTTCCGCACCAACAATCAOGCCGACTTTAA.....
HC1TTCGATTGAT.....TOGAT.....TTGAG.....

상기 표 2에서 각 서열의 기원은 다음과 같다:

EC1-완전한 계놈의 이.콜라이 염기 2874223 내지 2885223(5416-5614)

EC2-완전한 계놈의 이.콜라이 염기 4067762 내지 4083201(4741-4852)

EC3-완전한 계놈의 이.콜라이 염기 2244905 내지 2255428(2027-2108)

EC4-완전한 계놈의 이.콜라이 염기 2244905 내지 2255428(2064-2109)

EC5-이.콜라이 플라스미드 합성 클로닝 벡터 pET31F(258 376)

EC6-이.콜라이로부터의 플라스미드 pKF3(2004-2066)

EC7-클로닝 벡터 pGEM-5Zf(-)(75-170)

EC8-미국특허 제4921698호의 서열

PD1-pGEM-T 벡터(401-519)

PD2-pGEM-T 벡터(1130-1306)

PD3-pGEM-T 벡터(2513-2610)

PD4-pGEM-T 벡터(1685-1795)

EC9-완전한 계놈의 이.콜라이 염기 220025 내지 231029(829-872)

HC1-호모 사피엔스 새텔라이트 2 반복 요소 DNA

3-3 세포내에 유입된 DNA의 프로세싱 확인

세포내로 프로세싱되어 유입된 50-200 bp의 클로닝된 DNA조각이 세포내에서 프로세싱이 얼마나 더 진행되는지와 DNA 염기서열의 종류에 따라 세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 반응액은 0.2 mM dNTP, 각각 10 pmole의 프라이머, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 그리고 2.5 units의 *Taq* 폴리머라제를 포함하고 있다. PCR 프라이머로는 5'-CTCCCGGCCGCCATG-3' 및 5'-TTGGGAGCTCTCC-3' (표 1)을 합성하여 이용하였다.

PCR반응은 다음과 같은 조건에서 35회 반복하였다: 변성(30초간 94°C); 프라이머 어닐링(30초간 42°C); 프라이머 연장(50초간 72°C). PCR 생성물은 TBE 완충용액에서 8% 천연-PAGE를 수행한 후 에티뮴 브로마이드로 염색한 후 PCR반응 생성물을 겔에서 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 에탄올로 침전시킨 후 세포 배양에 이용하기 위해서는 PBS로 녹였고 엔도뉴클레아제의 활성을 측정하기 위해서는 TE 완충용액에 녹였다.

엔도뉴클레아제의 작용에 의해 절단된 100-200bp의 박테리아 DNA를 클로닝한 벡터에서 PCR 증폭하여 획득한 생성물이 세포내에 유입되어 최종 산물이 어떠한 형태로 존재하는지 확인하기 위하여 PCR 생성물인 EC1, EC2, 그리고 HC1 DNA 조각을 랜덤 프라이머와 클레노우 효소를 이용한 랜덤-프라이밍 방법으로 DNA를 ^{32}P 로 표지하였다. ^{32}P 로 표지된 DNA조각을 IM9 세포주와 U937 세포주 그리고 TPA를 처리한 U937 세포주에 100 ng/ml로 넣고, 일정한 시간 간격으로 DNA가 세포에 유입되는지를 확인하였다. 세포내에서 엔도뉴클레아제의 효소활성을 저해시키기 위해서는 0.2 mM ZnSO_4 (Sigma)를 처리하였다. 세포내로 유입된 DNA는 세포 용해물에서 다시 DNA를 회수한 다음 TBE 완충용액에서 20% 천연-PAGE를 수행하고 겔을 말려서 방사선 사진 촬영(autoradiography)을 수행하여 세포내에서 DNA가 프로세싱되는 과정과 엔도뉴클레아제 작용에 의한 최종 반응산물을 확인하였다.

^{32}P 로 표지된 EC1 DNA 조각을 IM9 세포주에 유입시킨 후 세포에 유입된 DNA를

세포 용해물에서 추출하여 20% 천연-PAGE를 수행한 후, 프로세싱된 ^{32}P 로 표지된 DNA를 겔에서 추출하여 표 1에 나타난 합성한 여러 종류의 올리고뉴클레오타이드들과 어닐링시켜 염기서열을 비교하였다. 세포내에서 추출한 ^{32}P 로 표지된 DNA 일정량과 각각의 올리고뉴클레오타이드 10 ng을 6X SSC에서 혼합한 다음 100°C에서 5분간 끓인 후 온도를 30초에 1°C씩 T_m 이하로 낮추어 어닐링시켰다. 어닐링시킨 반응물을 TBE 완충용액에서 20% 천연-PAGE를 4°C에서 수행한 후 방사선 촬영을 통해서 세포내에 유입된 DNA와 상보적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 확인하였다. 표준으로는 DNA와 올리고뉴클레오타이드를 어닐링시키지 않은 혼합물과 세포내에 유입된 DNA 단독으로 변성, 어닐링시킨 DNA를 이용하였다. 합성한 올리고뉴클레오타이드들의 염기서열들은 EC1 DNA조각에 존재하는 올리고 A, B 와 EC1 DNA에 존재하지 않는 올리고 C, D, E를 이용하였다(표 1).

사람의 B-림프아 IM9 세포주 와 골수발생 U937 세포주 그리고 TPA를 처리하여 분화가 유도된 U937 세포주에 의한 외부 DNA의 유입 및 세포주내에서의 프로세싱을 확인하였다. 실험 결과, 앞에서 염기서열을 밝힌 100-200 bp를 PCR 증폭하여 ^{32}P 로 표지시킨 박테리아 DNA 조각으로 확인할 수 있었다. IM9 세포주에서 외부 DNA 유입 및 세포내에서 프로세싱은 도 22의 결과에 나타난 바와 같다. 157 bp(EC1)의 DNA 조각이 4°C에서는 세포내로 유입되지는 않고 세포막에 결합되어 있음을 알 수 있었고, 37°C에서의 배양 시간에 따라 세포내에서 프로세싱이 일어나며 24시간 후에는 20% 천연-PAGE 상에서 약 10 bp의 DNA 조각이 최종산물로 생성됨을 알 수 있었다.

10 bp로 판단되었던 이 DNA 조각은 이후의 실험에서 일본새 구조인 것으로 밝혀졌으며 20% 변성-PAGE (8.3 M urea)에서도 일본새 DNA임을 확인할 수 있었다. U937 세포주와 TPA 처리로 분화된 U937 세포주에서 관찰한 외부 DNA 유입 및 세포내에서의 프로세싱은 도 23에서와 같다. TPA를 처리하지 않은 U937세포주에서는 도 23A의 결과로 외부 DNA가 세포에 결합하거나 또는 유입은 되지만 전혀 프로세싱이 일어나지 않음을 알 수 있었다. 그러나 도 23의 B에서는 TPA를 처리하여 분화된 U937세포주에 의하여 외부 DNA의 유입과 세포내 프로세싱을 확인할 수 있었다. 한편, 도 23의 B에서 볼 수 있는 바와 같이 0.2 mM Zn^{2+} 에 의해 세포내에서 DNA 프로세싱이 저해 받았음을 알 수 있었다.

지금까지의 실험 결과에서 면역세포가 외부의 DNA를 프로세싱하여 10개 염기의 최종 반응산물을 생성하는 것으로 밝힌데 이어 이 DNA 조각의 염기서열 특성을 확인하였다. PCR반응에 의해 증폭된 EC1 DNA 생성물을 ^{32}P 로 표지하여 세포내로 유입시킨 후, 세포내 엔도뉴클레아제에 의해 프로세싱된 10개 염기의 DNA 조각을 EC1의 부분 서열과 일치하는 여러 종류의 합성 올리고뉴클레오타이드들과 어닐링시켜 상보적으로 결합되는 염기서열을 확인할 수 있었다(도 24). 어닐링 결과 가장 많이 상보적으로 결합한 올리고뉴클레오타이드는 표 1의 Oligo A로서 EC1 DNA에 존재하는 염기서열이며 AACGTT motif를 가진 서열이었다. 이 결과로 부터 엔도뉴클레아제의 효소활성에 의해 세포 내부에서 면역세포를 활성화시키는 박테리아 DNA의 염기서열로 알려진 CpG motif가 생성되었다는 사실을 구체적으로 확인하였다.

3-4 박테리아 DNA에 의한 IM9 세포주의 IgM분비 확인

B 세포를 활성화시켜 사이토카인들과 IgM을 분비시키는 것으로 알려진 CpG motif를 가진 올리고뉴클레오타이드들을 합성하였다. 엔도뉴클레아제 작용에 의해 생성된 DNA 조각중 EC1에 존재하는 올리고 A, EC2에 존재하는 올리고 B 그리고 CpG motif가 없는 올리고 E를 합성하였다(표 1). 또한 CpG motif를 여러 개 함유하고 있는 EC1, EC2 PCR 생성물 그리고 여러 종류의 DNA를 실험에 이용하였다. CpG motif를 메틸화시키기 위해서 박테리아 DNA를 엔도뉴클레아제로 처리하여 얻은 100-200 bp 조각을 준비하였다. 메틸화 반응은 30 ug의 DNA를 15 unit의 CpG 메틸라제와 160 uM S-아데노실메티오닌이 함유된 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 그리고 1 mM DTT)을 혼합하여 37°C에서 3시간 동안 반응시켰다. CpG 메틸화는 *Hpa* II를 처리하여 확인하였다.

사람의 B-림프아 세포주인 IM9 세포주를 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지에서 배양 초기에 세포수를 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 로 하였으며, 미리 확보된 여러 종류의 올리고뉴클레오타이드와 DNA를 25 ug/ml로 처리하고 24시간 배양 후 세포배양액을 획득하였다.

평저 평판을 0.1 M 카보네이트 완충용액(pH 9.6)에 있는 안티-사람 μ -쇄-특

이적 IgM (5 ug/ml, Sigma)을 100 ul/웰로 4°C에서 16시간 동안 방치하였다. 이 평판을 PBS로 3회 세척한 다음 1% BSA로 실온에서 2시간 동안 방치하고 TPBS (0.05% Tween-20 in PBS)로 3회 세척하였다. 적당히 희석한 세포배양액 또는 정제한 사람의 IgM (Sigma)을 100 ul/well씩 넣어주고 실온에서 2시간 동안 방치한 후 TPBS로 3회 세척하였다. 여기에 1% BSA를 함유한 PBS에 1/4,000로 희석한 고추냉이 퍼옥시다제-연결된 안티-사람 Ig를 1시간 동안 실온에서 방치한 후 TPBS로 세척하였다. 여기에 0.05 M 포스페이트 완충용액(pH 5.0)에 녹아 있는 σ -페닐렌디아민 디하이드로클로라이드를 30분 동안 처리하여 발색시켰다. 발색반응을 0.67 N H₂SO₄를 처리하여 멈추고 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 IgM을 정량하였다.

합성한 올리고뉴클레오타이드들로 IM9 세포주를 처리하여 48시간 후에 분비된 IgM의 양을 측정하였을 때, CpG motif를 가진 올리고 A 와 올리고 C에서는 2-3 ng/ml로 분비되는 것을 확인할 수 있었으나, CpG motif가 없는 올리고 E에 의해서는 0.5 ng/ml로 합성된 것을 확인할 수 있었다(도 25). 또한 박테리아 DNA와 CpG motif를 여러 개 가진 박테리아 DNA의 PCR 생성물(Table 1. EC1, EC2 DNA)들에 의해서도 2-3 ng/ml로 IgM을 분비하였으나, 박테리아 DNA의 CpG motif를 메틸화한 다음 세포주 배양액에 처리하였을 경우에는 IgM의 분비가 일어나지 않음을 관찰하였다(도 25). 박테리아의 DNA와 비교하여 연어정자 DNA에 의해서도 IgM의 분비는 증가되지 않았다. 이상의 결과로부터 박테리아 DNA의 CpG motif가 IM9 세포주를 활성화시켜 IgM의 분비를 증가시켰다는 사실을 확인하였고, 이전의 여러 연구자들이 합

성한 CpG motif를 사용하여 밝힌 연구 결과들과 일치하였다.

3-5 외부 DNA 프로세싱에 관여하는 엔도뉴클레아제 효소활성의 특성

PCR로 증폭된 EC1, EC2, HC1 DNA를 랜덤 프라이머와 클레노우 효소를 이용한 랜덤-프라이밍방법에 의하여 ^{32}P 로 표지하였다. 또한 더 짧은 DNA를 얻기 위하여 EC2 DNA를 *Alu* I으로(Promega Inc) 처리하여 조각내어 5'-말단을 ^{32}P 로 표지하여 기질로 이용하였다. 엔도뉴클레아제의 효소활성의 특성을 연구하기 위하여 EC1 DNA를 5'-말단 표지 또는 3'-말단 표지하여 이용하였다. 5'-말단 표지는 10 ng EC1 DNA, [γ - ^{32}P] ATP 50 uCi, 키나제 완충용액 그리고 5 unit의 폴리뉴클레오타이드 키나제(Promega Inc.)를 섞고 37°C에서 1시간 반응시켜 수행하였다. 3'-말단 표지는 10 ng EC1 DNA, [α - ^{32}P] CTP 50 uCi, TdT 완충용액 그리고 5 unit의 터미널 데옥시트랜스퍼라제(Boehringer mannheim)를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 기질로 이용하였다.

위에서 준비한 랜덤-프라이밍 방법으로 표지한 5 ng의 EC1, EC2, HC1 DNA 그리고 *Alu* I으로 처리하고 5'-말단 표지한 EC2 DNA를 20 ul의 FBS가 없는 IM9 세포 배양액과 혼합하여 37°C에서 일정한 시간 간격으로 반응시켰다. 또한 세포배양액의 양을 증가시켜서도 효소활성을 측정하였다. 이 반응액을 페놀/클로로포름으로 처리하여 단백질을 제거하고 차가운 에탄올로 침전시켜 TBE 완충용액에서 20% 천연

-PAGE와 20% 변성-PAGE (8.3 M 우레아)로 전기이동 시키고 겔을 건조시킨 후 방사선 사진 촬영을 해서 효소활성에 대한 반응산물을 분석하였다. FBS에 존재하는 DNase I의 효소활성정도 비교하기 위하여 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지 20 ml 와 여러 기질들과도 반응시켰다. 또한 엔도뉴클레아제의 저해물질인 Zn^{2+} (1 mM) 과 킬레이트화제인 EDTA (10 mM)이 효소활성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 이때 분자량의 표준 물질로는 브로모페놀 블루(BPB)와 크실렌 사이놀(XC)을 이용하였다. 변성-PAGE에서 BPB는 8개 염기에 위치하고 XC는 28개 염기에 위치하며, 천연-PAGE에서는 각각 12 bp 와 45 bp에 위치하였다.

엔도뉴클레아제 효소활성의 특성 및 최종 반응생성물의 특성을 연구하기 위하여 표 2에 제시된 EC1 과 EC2 그리고 HC1 DNA를 랜덤-프라이밍 방법을 이용하여 ^{32}P 로 표지한 후 기질로 이용하였다. 이러한 기질들을 FBS가 없는 배지에서 배양한 IM9 세포배양액으로 반응시킨 결과 도 26과 도 27 그리고 도 28에 제시된 바와 같이 약 10개 염기의 DNA 최종 반응물이 생성되었음을 볼 수 있었다. 이 결과에서 엔도뉴클레아제는 DNA의 염기서열을 특이적으로 인식하지는 못한다는 것을 알 수 있었으며, 염기서열에 관계없이 외부의 DNA에 작용하여 약 10 염기의 DNA 조각을 만들어 낼 수 있다. 그리고 엔도뉴클레아제의 저해물질인 Zn^{2+} 와 킬레이트화제인 EDTA에 의해서 효소활성이 저해되는 결과를 볼 수 있었다(도 26, 27, 28, 29). 또한 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배지에 의해서도 DNA의 분해가 발생되지 않음을 알 수 있었다(도 26, 27, 28, 29). 이상과 같은 결과들은 세포내에서 엔도뉴클레아

제 작용에 의해 유입된 DNA의 프로세싱으로 형성되는 반응생성물과 동일함을 생체 외(in vitro) 실험으로 확인한 것이다. 지금까지 연구한 엔도뉴클레아제 효소활성의 최종 반응생성물이 약 10개 염기의 DNA조각으로 이루어짐을 확인할 수 있었는데, 엔도뉴클레아제의 양을 증가시키고(도 30) 반응시간을 24시간까지 지속시켰을 경우에도(도 31) 효소반응에 의해 형성된 최종산물인 약 10개 염기의 DNA조각은 더 이상 분해되지 않음을 알 수 있었다. 즉, 본 발명에서 밝힌 엔도뉴클레아제는 약 10개 염기 이하의 DNA 조각에는 활성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

또한, 도 32에서는 PCR로 증폭한 EC2 DNA 생성물을 *Alu* I으로 처리하여 생성된 DNA 조각을 엔도뉴클레아제로 반응시킨 결과 최종 생성물이 생성되기 이전에 형성되는 엔도뉴클레아제 반응산물들인 여러 DNA 조각들을 볼 수 있었다. 이 실험에서 이용한 기질은 *Alu* I으로 반응시킨 DNA의 5'-말단에 ^{32}P 로 표지하여 사용했는데, 표지된 효소반응 최종산물이 약 10개 염기로 나타난 결과로부터 일본새 DNA를 생성하기 위한 5'-엑소뉴클레아제 효소활성은 존재하지 않는 것으로 확인하였다.

IM9 세포주의 엔도뉴클레아제가 3'-엑소뉴클레아제 또는 5'-엑소뉴클레아제 효소활성을 가지는지 확인하기 위하여 5'- 또는 3'-말단에 각각 ^{32}P 로 표지된 EC2 DNA를 기질로 이용하여 엔도뉴클레아제로 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 상기와 동일한 방법으로 방사선 사진 촬영하여 반응생성물을 비교하였다. 또한 일본새 DNA에는 엔도뉴클레아제 효소활성이 어떻게 나타나는지 확인하기 위하여 표지된 DNA를

100°C에서 5분간 끓인 후 얼음에서 급속히 냉각시키고 엔도뉴클레아제와 위에서처럼 반응시키고 반응생성물을 확인하였다.

도 33의 결과에서 5'-말단에 표지한 기질에 엔도뉴클레아제가 작용하여 약 10개 염기의 DNA 조각이 형성(5'-말단 표지, 라인 2)되는 것을 보여 주었는데, 이 결과는 도 32에 나타난 결과와 같다. 즉, 엔도뉴클레아제에 5'-엑소뉴클레아제 활성이 존재하지 않음을 확인하였다. 그러나 3'-말단에 ^{32}P 로 표지한 기질에서는 효소 반응 최종 생성물인 약 10개 염기의 DNA 조각이 방사선 사진 촬영에서 형성되지 않음을 보여 주는데, 이는 3'-엑소뉴클레아제 효소활성이 작용하여 ^{32}P 로 표지된 3'-말단이 모노뉴클레아타이드로 분해되었음을 보여준다. 그러나 ^{32}P 로 표지한 기질을 100°C에서 10분간 끓여준 후 얼음에서 급속히 온도를 낮춰 일본쇄로 전환시킨 후, 엔도뉴클레아제를 반응시키면 5'- 또는 3'-말단에 표지된 DNA 기질에서 모두 효소 반응 생성물로 약 10개 염기의 표지된 DNA 조각을 형성하였다. 이상의 실험 결과에 근거하여 3'-엑소뉴클레아제 효소활성이 일본쇄에는 작용하지 않음을 알 수 있었다.

세포배양액에 존재하는 엔도뉴클레아제의 효소활성에 의해 생성된 최종 반응 산물과 세포내에서 프로세싱되어 생성된 최종 생성물 그리고 DNase I의 작용에 의해 생성된 반응생성물을 비교하기 위하여, 소의 췌장 DNase I (Boehringer Mannheim) 5 unit 과 랜덤-프라이밍 방법에 의해 ^{32}P 로 표지한 EC1 DNA를 10 mM

Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂ 완충용액에서 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이 반응생성물을 20% 천연-PAGE 와 20% 변성-PAGE (8.3 M urea)를 수행한 후 방사선 사진 촬영을 해서 엔도뉴클레아제의 효소활성 최종 반응산물과 비교하였다. 또한 엔도뉴클레아제 효소활성의 최종 생성물이 일본쇄로 존재한다는 것을 확인하기 위하여 S1 뉴클레아제로 처리하여 확인하였다. S1 뉴클레아제 효소활성은 랜덤-프라이밍 방법에 의해 ³²P로 표지된 기질에 작용하여 생성된 엔도뉴클레아제 반응 최종 생성물 과 S1 뉴클레아제 반응 완충용액(7X 완충용액, 0.3 M 아세트산 칼륨, pH 4.6, 2.5 M NaCl, 10 mM ZnSO₄, 50% 글리세롤)에 포함된 3 unit의 S1 뉴클레아제와의 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 반응시켜서 확인하였다. 최종 반응생성물은 동일한 실험 방법으로 방사선 사진 촬영하여 확인하였다.

엔도뉴클레아제의 효소활성에 의해 생성된 최종 생산물 과 DNase I의 작용에 의해 생성된 반응생성물을 비교한 결과, 도 34에 나타난 것과 같이 세포 배양액의 엔도뉴클레아제(레인 2)와 세포 내부의 엔도뉴클레아제(레인 3)에 의해 프로세싱된 DNA 반응산물은 모두 약 10개 염기의 DNA 조각 이었으나, DNase I의 작용(레인 4)에 의해서는 10개 염기 이하로 분해된 DNA 조각이 나타나며 계속 분해되어 모노뉴클레오타이드로 분해됨을 볼 수 있었다. 또한 엔도뉴클레아제반응에 의한 최종 생성물이 일본쇄로 존재한다는 것을 확인하기 위하여 S1 뉴클레아제로 처리하여 효소 반응 생성물을 관찰하였다. 엔도뉴클레아제의 최종산물인 약 10개 염기의 반응산물을 S1 뉴클레아제와 다시 반응시켰을 때 도 35에서처럼 완전히 모노뉴클레오타이드

로 분해되었음을 볼 수 있었다. 즉, 엔도뉴클레아제의 효소활성에 의해 생성된 약 10개 염기의 DNA 조각은 일본새로 존재한다는 명확한 증거를 제시하였다.

실시예 4

IM9 세포주에서 분리되는 엔도뉴클레아제 의 정제 및 특성 규명

IM9 세포주가 지금까지 규명된 뉴클레아제들과 구분되는 Mg^{2+} -의존성 엔도뉴클레아제를 생합성하고 분리한다는 사실을 밝혔다. 또한 IM9 세포주의 핵에도 이 효소가 존재하여 apoptosis 과정에 관여하고 있음을 제시하였다. Apoptosis에 관여하는 엔도뉴클레아제들은 Mg^{2+} -의존성 엔도뉴클레아제[Anzai N. et al (1995) *Blood* 86, 917-923; Kawabata H. et al (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 247-254; Sun X. M., and Cohen G. M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 14857-14860; 및 Kawabata, H. et al (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 133-138], Ca^{2+}/Mg^{2+} -의존성 엔도뉴클레아제[Stratling W. H. et al (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5893-5898; Pandey S. et al (1997) *Biochemistry* 36, 711-720; 및 Ribeiro J. M., and Carson D. A. (1993) *Biochemistry* 32, 9129-9136], DNase I[Peitsch M. C. et al (1993) *EMBO J.* 12, 371-377], 그리고 NUC18[Kawabata, H. et al (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 133-138] 등이 있으나, 이들 엔도뉴클레아제의 정제 및 생화학적 특성 그리고 생리적인 기능에 대하여는 명확히 규명되지 않고 있다. 또한 박테리아 DNA를 외부 물질로 인식하여 프로세싱하는 기능에

관여하는 엔도뉴클레아제도 보고된 바 없다. 따라서 본 발명에서는 IM9 세포주에서 합성되고 분비되는 엔도뉴클레아제를 세포배양액에서 정제하여 그 특성을 규명하였다.

4-1 단백질원 및 엔도뉴클레아제 효소활성 측정

엔도뉴클레아제를 분비하는 IM9 세포주를 열처리한 10% FBS를 함유하는 RPMI1640 배지에서 대량 배양하여 세포배양액을 효소원으로 사용하였다. 세포배양액과 IM9 세포주를 분리하기 위하여 1,500 x g에서 5분간 원심분리하여 세포배양액을 수득하였다. 총 10 l의 세포배양액을 4°C에서 30분간 14,000 x g로 원심분리하여 상층액을 효소원으로 사용하였다.

엔도뉴클레아제 정제과정에서 효소 활성은 초나선 플라스미드 DNA를 기질로 이용하여 선형 DNA 형성과 분해되는 정도로 측정하였다. 10 mM $MgCl_2$ 를 함유한 20 mM Tris-HCl (pH7.0) 완충용액에 100 ng의 플라스미드 DNA를 넣고 단백질 정제 과정에서 정중의 시료 20 ul와 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 효소반응은 DNA 시료 완충용액으로 정지시키고 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 효소활성을 확인하였다.

4-2 엔도뉴클레아제의 정제

세포배양액에 황산암모늄을 서서히 가하여 80% 포화되도록 한 후 $14,000 \times g$ 에서 원심분리 하여 침전물을 20 mM 아세트산 나트륨(pH 5.2) 완충용액에 하룻밤 동안 투석하였다. 이 효소용액중 5 ml을 동일한 완충용액으로 미리 평형시킨 모노 S 컬럼(0.5 x 5.0 cm, Pharmacia LKB)에 주입하였다. 동일한 완충용액에서 0 -0.08 M NaCl 직선 농도구배(15 ml)를 형성하여 단백질을 1차로 용출하였고, 0.08 M NaCl 이 포함된 동일 완충용액 15 ml를 더 통과시켰다. 이어서 0.08 -0.2 M NaCl 직선 농도구배(20 ml)를 형성하여 2차로 단백질을 용출하였다. 각 분획의 부피는 1 ml이고 유속은 0.5 ml/min 이었다. 이상의 과정을 반복하여 엔도뉴클레아제를 가진 분획을 모아 센트리콘으로 농축한 후 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 함유한 50 mM 인산나트륨(pH 7.0) 완충용액으로 평형시켰다. 이 효소원을 동일한 완충용액으로 평형시킨 RESOURCE PHE 컬럼(0.64 x 30 mm, 1 ml, Pharmacia LKB)에 주입하여 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하였다. 동일한 완충용액 15 ml로 씻어 준 후, 1.5-0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 직선 농도구배를(25 ml) 형성하여 단백질을 용출하였다. 효소활성이 있는 분획을 센트리콘으로 농축한 후 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액으로 평형시켰다.

IM9 세포배양액을 황산암모늄으로 농축하여 정제에 이용하였다. 황산암모늄 분별침전을 농도차이를 두고 수행하였으나 효소분리에 많은 영향을 미치지 않아 80%의 농도로 처리하여 단백질을 침전시켜 정제를 실행하였다. 모노 S 컬럼을 통과

시킨 시료에서 효소활성은 0.08-0.2 M NaCl 직선 농도구배에서 회수되었다(도 36). 양이온 교환수지에서 효소활성이 있는 분획을 소수성 상호작용 크로마토그래피인 RESOURCE PHE 컬럼을 통과시켰다. 1.5-0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 직선 농도구배로 단백질을 용출하였을 때 직선 농도구배중 0.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도구배에 나타난 단백질 분획에서 엔도뉴클레아제 효소활성을 관찰할 수 있었다(도 37). 약 10 g의 단백질을 포함하는 10 리터의 IM9 세포주 배양액에서 정제된 엔도뉴클레아제를 정량한 결과 약 10 μg 이 회수된 것으로 나타났다.

4-3 천연 기공 구배 PAGE 및 SDS-PAGE에 의한 분자량 측정

양이온 교환수지 크로마토그래피에서 효소활성이 있는 분획을 모아 센트리콘으로 농축한 용액을 4-15% 직선 농도구배의 아크릴아미드 구배 겔에 주입하여 4°C에서 4-5 mA로 18 시간 전기영동을 수행하였다. 전기이동 후 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250으로 염색하여 단백질띠를 확인하였다. 단백질 띠에 해당하는 부위를 염색하기 전에 잘라내어 작은 조각으로 만든 후 20 mM Tris-HCl (pH7.0) 완충용액에서 4°C에서 8시간 동안 용출하였다. 용출된 단백질 분획중 엔도뉴클레아제 효소활성이 있는 부위를 초나선 플라스미드 DNA를 기질로 이용하여 확인하였다. 효소활성이 있는 분획을 농축하여 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 수행하였다. 이때 사용한 stacking gel은 4%이고 running gel은 7%였다. 천연 기공 구배 PAGE의 표준 단백질은 페리틴(ferritin)(440 kD), 카탈라제(232 kD), 락테이트 데하이드로게나제(140

kD) 그리고 소혈청알부민(67 kD)의 혼합액을 사용하였고, SDS-PAGE의 표준 단백질로는 마이오신(myosin)(200 kD), β -갈락토시다제(116.3 kD), 포스포릴라제 B (97.4 kD), 소혈청알부민(66.2 kD) 그리고 난알부민(45 kD)의 혼합물을 사용하였다.

모노 S 컬럼에서 용출된 효소활성이 있는 단백질 분획을 농축하여 4-15% 천연 기공 구매 겔 전기영동을 수행한 결과, 효소활성이 있는 단백질띠를 확인할 수 있었다(도 40). 효소활성이 나타난 단백질 띠는 명확하게 단일띠를 형성하지 않고 표준 단백질과 비교하여 140 kD 주위에 약간 퍼져 있음을 관찰할 수 있었다. 효소활성이 나타난 부위의 단백질을 용출하고 농축하여 SDS-PAGE를 수행한 결과(도 41) 크로마토그래피에 의해 정제된 엔도뉴클레아제(도 38)와 동일한 위치에서 순수하게 정제된 단백질띠를 확인하였고, 분자량이 약 72.4 kD임을 확인하였다(도 39). 천연 기공 구매 겔 전기영동의 결과와 SDS-PAGE의 결과를 비교하였을 때 엔도뉴클레아제는 호모다имер 형태로 존재하여 효소활성을 갖는 것으로 확인할 수 있었다.

4-4 정제한 효소의 특성 확인

엔도뉴클레아제 효소활성이 4시간 동안 나타나지 않는 U937 세포주에서 분리한 핵을 기질로 사용하였다. 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액에 함유된 분리한 핵에 1 mM Ca^{2+} , 1 mM Mg^{2+} , 1 mM Zn^{2+} 그리고 EDTA를 첨가해 효소활성 특이성을 37°C

에서 10분간 반응시켜 확인하였다.

U937 세포주에서 분리한 핵을 기질로 이용하여 정제한 효소의 이온 요구성을 관찰한 결과 Mg^{2+} 존재하에 효소활성이 나타남을 확인하였고, apoptosis의 저해물질인 Zn^{2+} 와 킬레이트화제인 EDTA에 의해서 효소활성이 완전히 저해되었음을 볼 수 있었다(도 42). 이러한 효소활성의 특성은 상기한 효소활성 특성과 일치하는 것이다.

【발명의 효과】

본 발명의 엔도뉴클레아제는 외부의 박테리아 DNA를 적절하게 분해하여 세포가 DNA를 유입하는 기능을 가지고 있으며 또한 세포에 유입된 DNA는 세포 내부의 엔도뉴클레아제에 의해 프로세싱이 일어나고 프로세싱된 외부 DNA의 CpG motif에 의하여 면역세포가 활성화되어 항체의 분비를 촉진하는 특징을 지니고 있다. 따라서, 본 발명의 엔도뉴클레아제는 면역보조제로서 그 산업상 이용가치가 있는 것이다.

【특허청구 범위】

【청구항 1】

면역세포로부터 분리되고 박테리아 DNA를 외부의 물질로 인식하고 프로세싱하여 면역반응에 관여하는 CpG motif를 갖는 약 10 bp의 일본새 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 엔도뉴클레아제.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 면역세포가 사람의 B 림프아 IM9 세포주 또는 12-O-테트라데카노일포르볼 13-아세테이트 처리된 U937 세포주인 엔도뉴클레아제.

【청구항 3】

제1항 또는 2항에 있어서, SDS-PAGE에 의한 분자량이 72.4 kD인 엔도뉴클레아제.

【청구항 4】

제1항 또는 2항에 있어서, 효소활성이 Mg^{2+} 의존성인 엔도뉴클레아제.

【청구항 5】

제1항 또는 2항에 있어서, 반응의 최적 pH가 6.6 내지 7.6인 엔도뉴클레아

제.

【청구항 6】

제1항 또는 2항에 있어서, DNase I과는 천연-PAGE에서 효소활성의 이동 거리가 뚜렷하게 구분되는 엔도뉴클레아제.

【청구항 7】

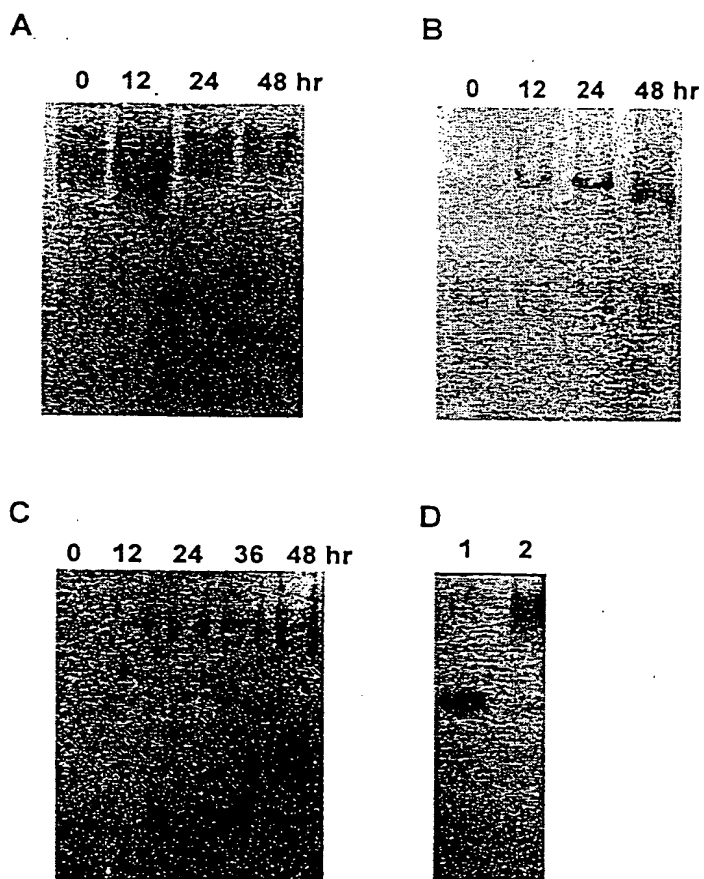
사람의 B-림프아 IM9 세포주 또는 TPA로 처리된 골수형성 U937 세포주를 엔도뉴클레아제를 생성하기에 적절한 배지에서 배양하고 이 배양액으로부터 상기 면역세포에서 합성되어 분비된 엔도뉴클레아제를 정제함을 포함하는, CpG motif를 갖는 약 10 bp의 일본쇄 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 엔도뉴클레아제의 제조방법.

【청구항 8】

제1항의 엔도뉴클레아제로 박테리아 DNA를 처리하여 형성된 CpG motif를 갖는 약 10 bp의 일본쇄 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 면역보조제.

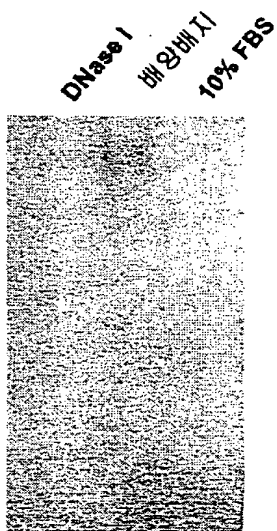
【도면】

【도 1】

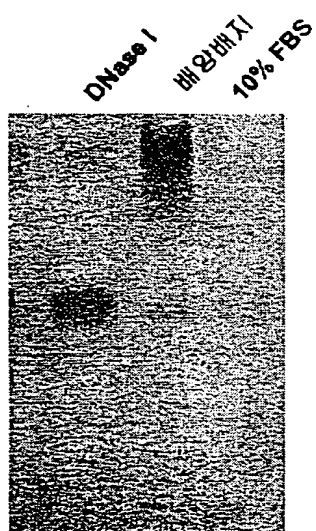


【도 2】

A



B



【도 3】

A

10% FBS

배지

사람혈청



IP :

모역전

인티-DNase I

안티-DNase I

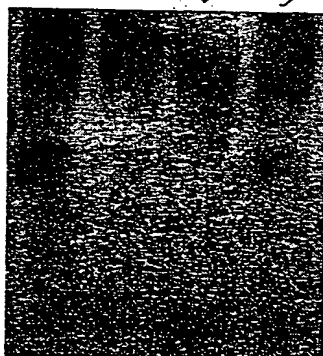
B

IP :

면역전

다백질 A 비드
안티-D

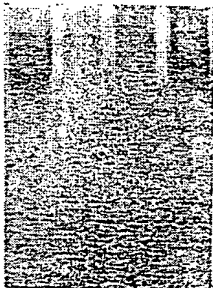
안티-DNase I



【도 4】

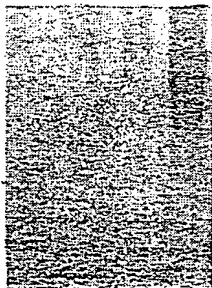
A

0 12 24 48 hr



B

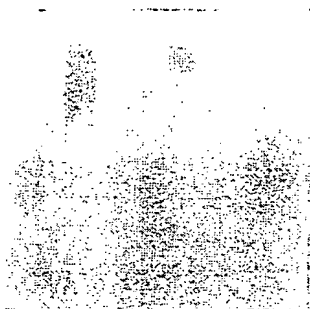
0 12 24 48 hr



【도 5】

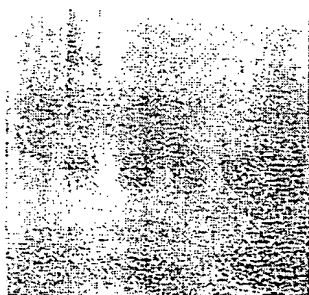
A

1 2 3 4 5 6

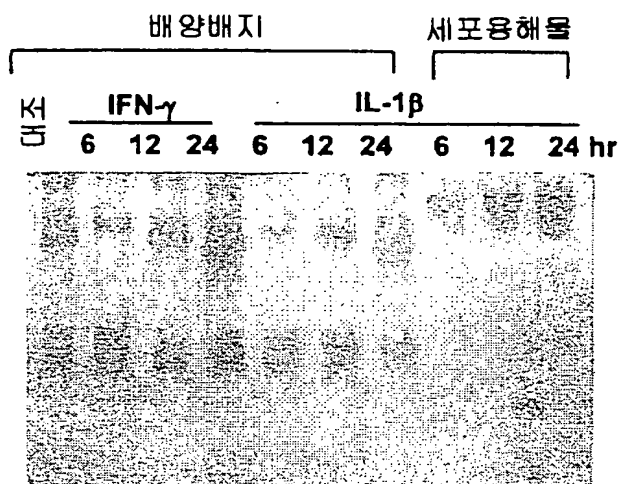


B

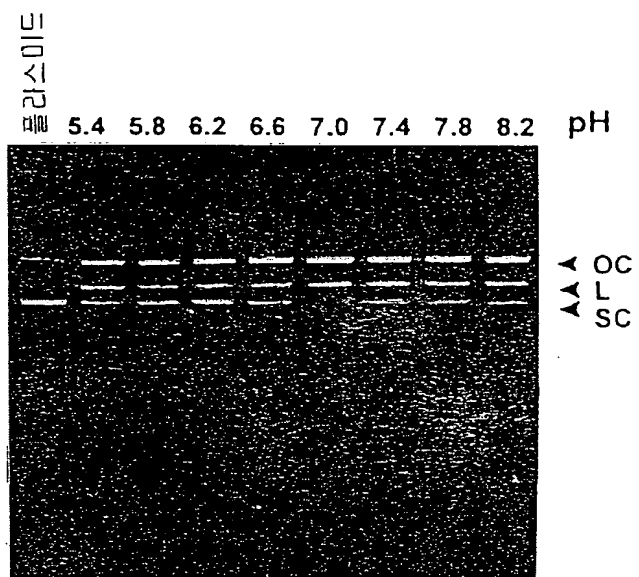
1 2 3 4 5 6



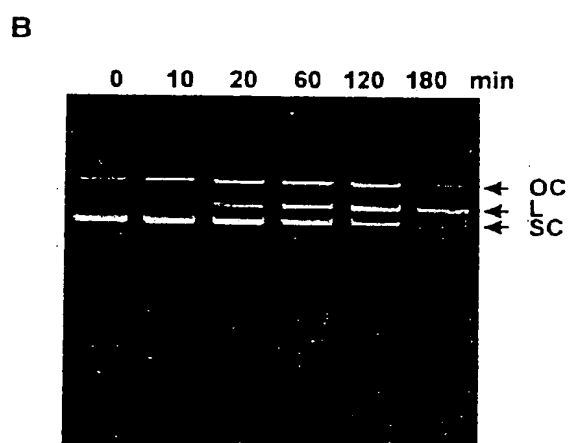
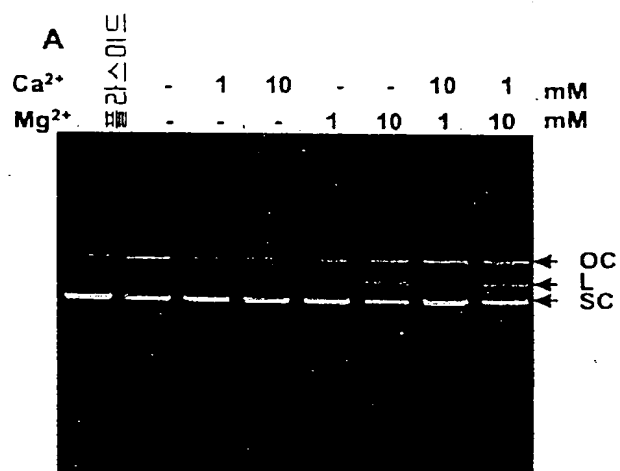
【도 6】



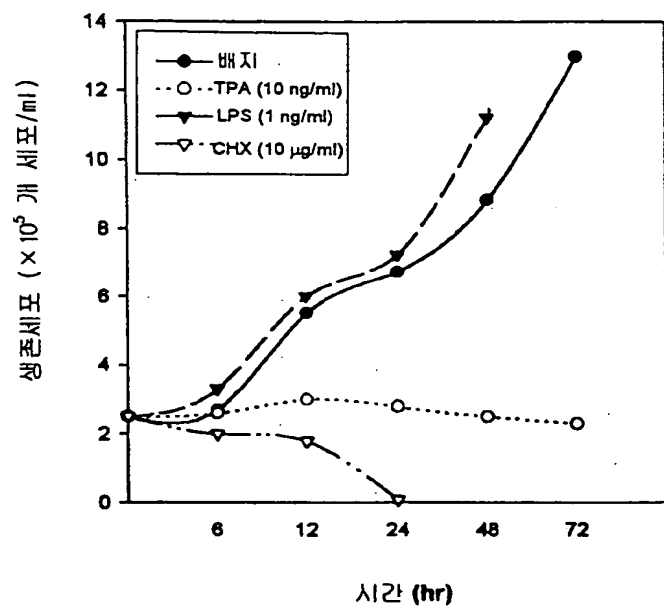
【도 7】



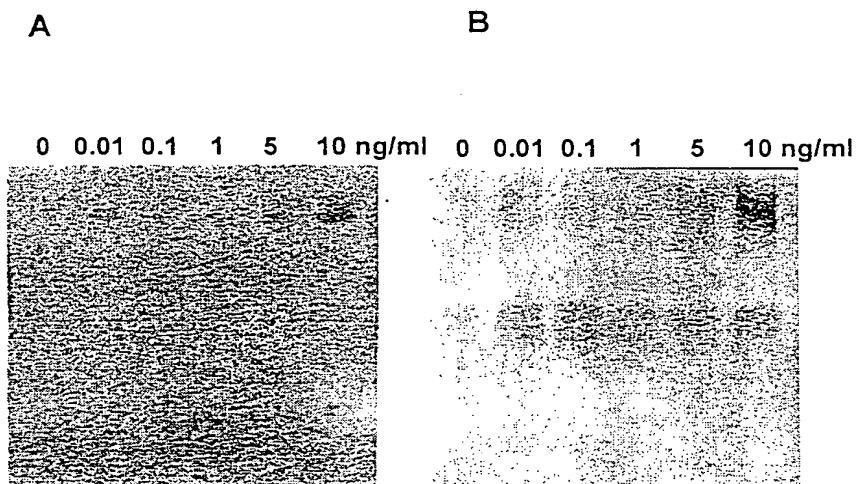
【도 8】



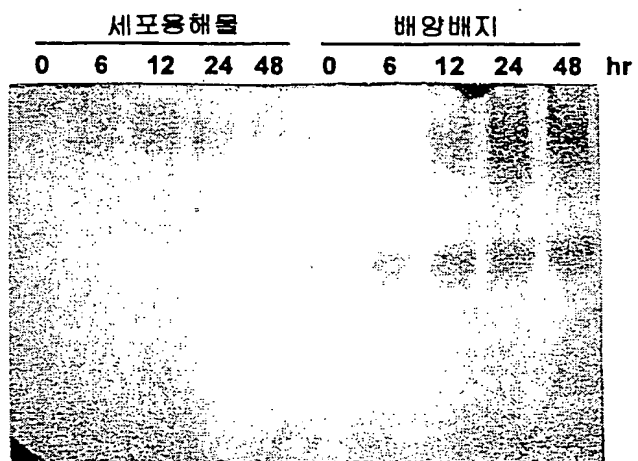
【도 9】



【도 10】

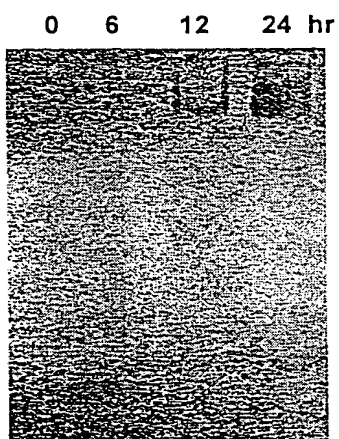


【도 11】

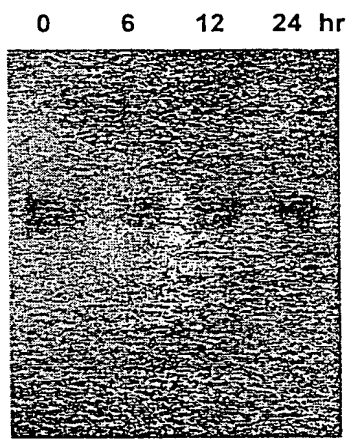


【도 12】

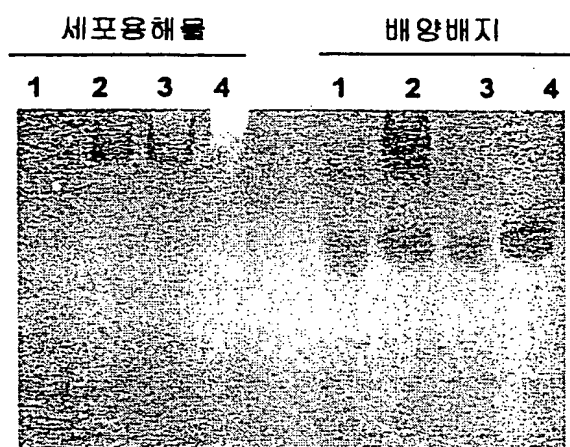
A



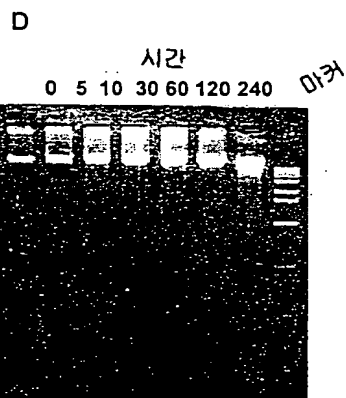
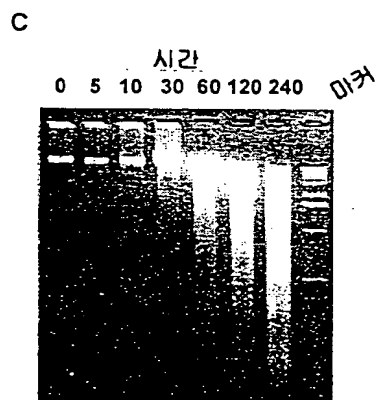
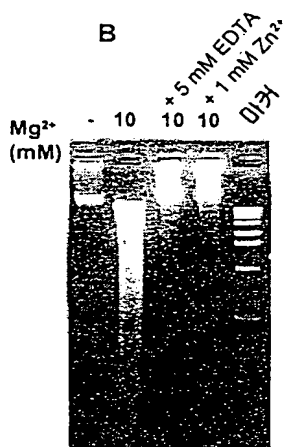
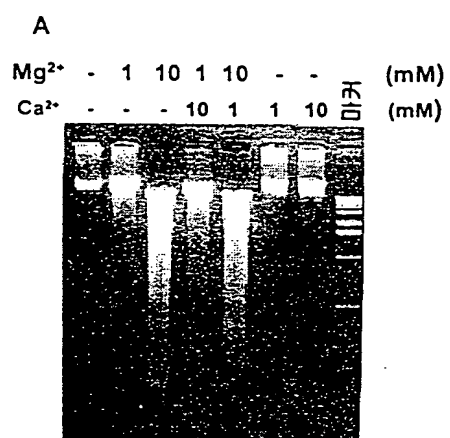
B



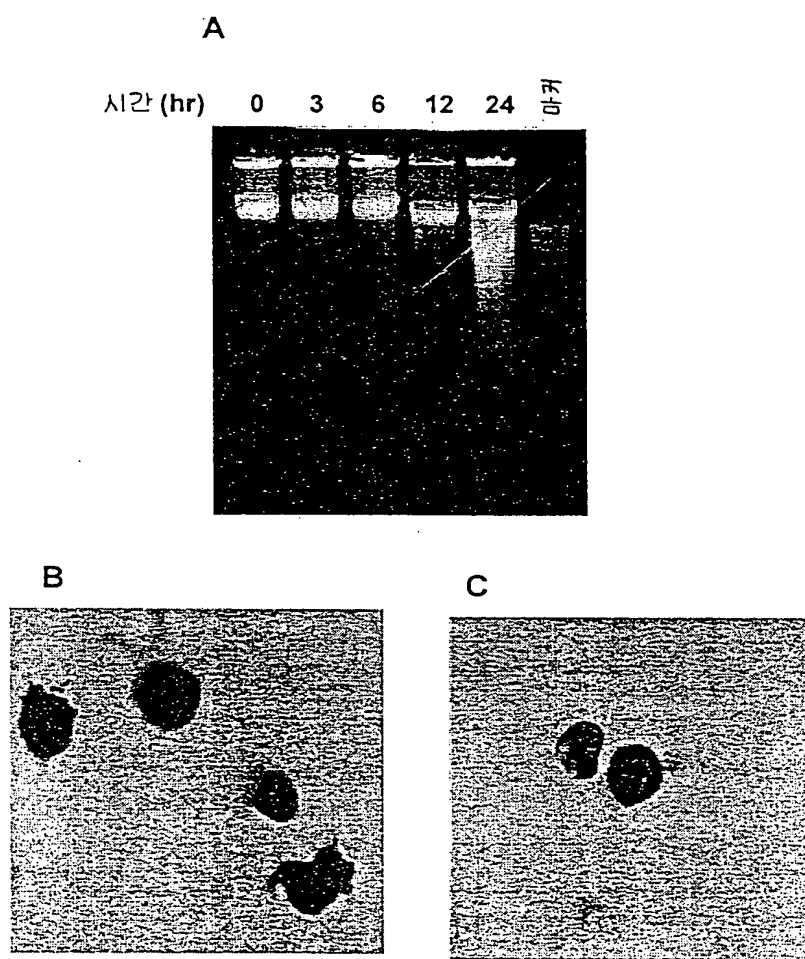
【도 13】



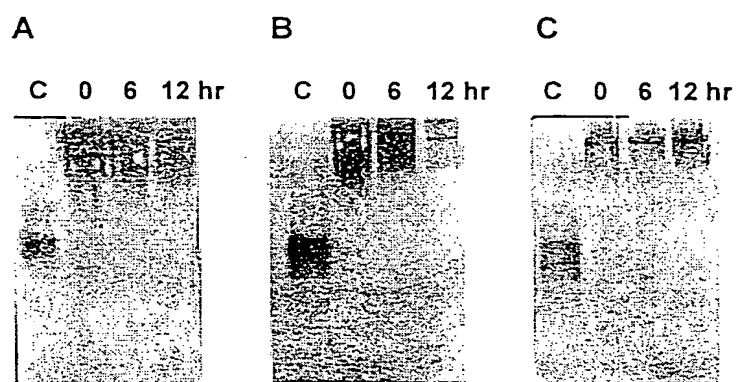
【도 14】



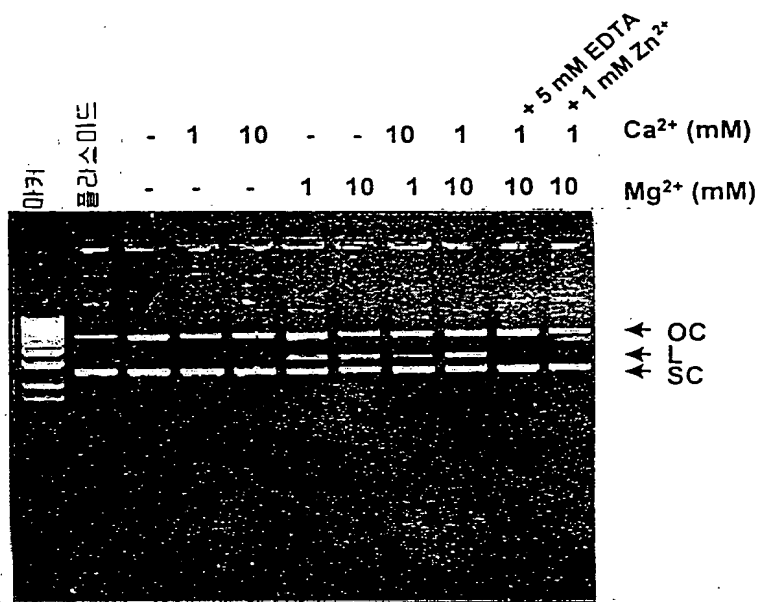
【도 15】



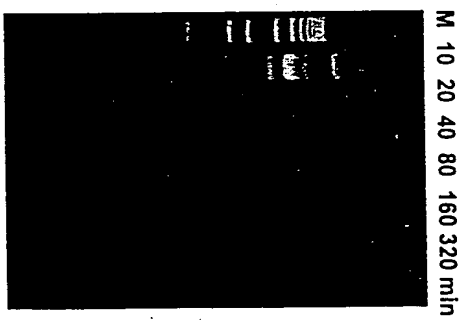
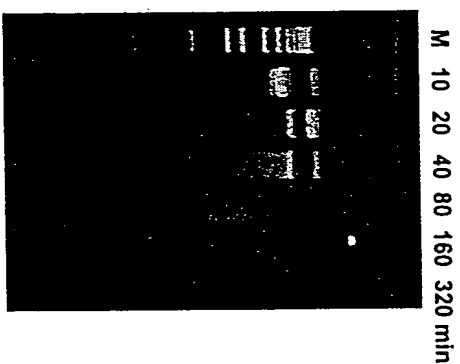
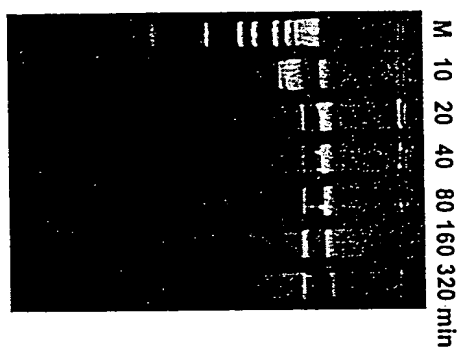
【図 16】



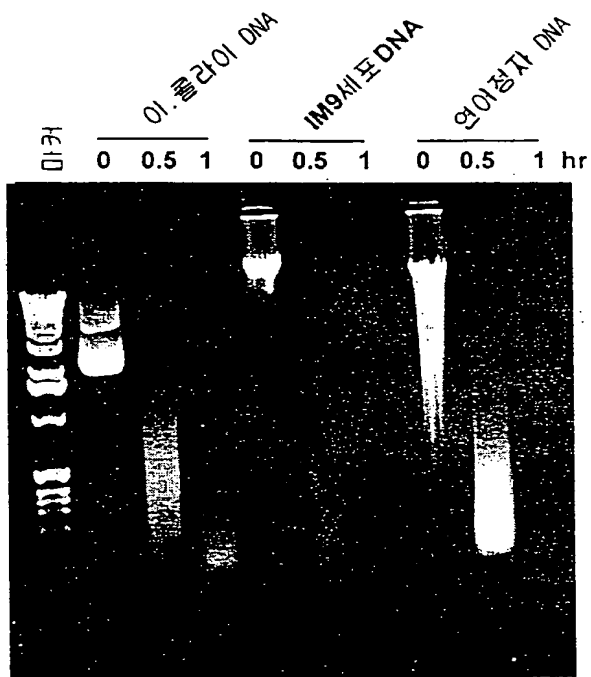
【도 17】



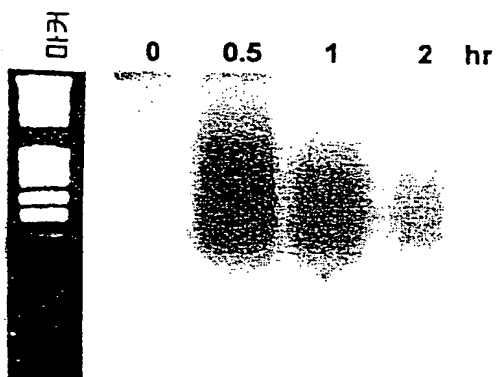
【도 18】



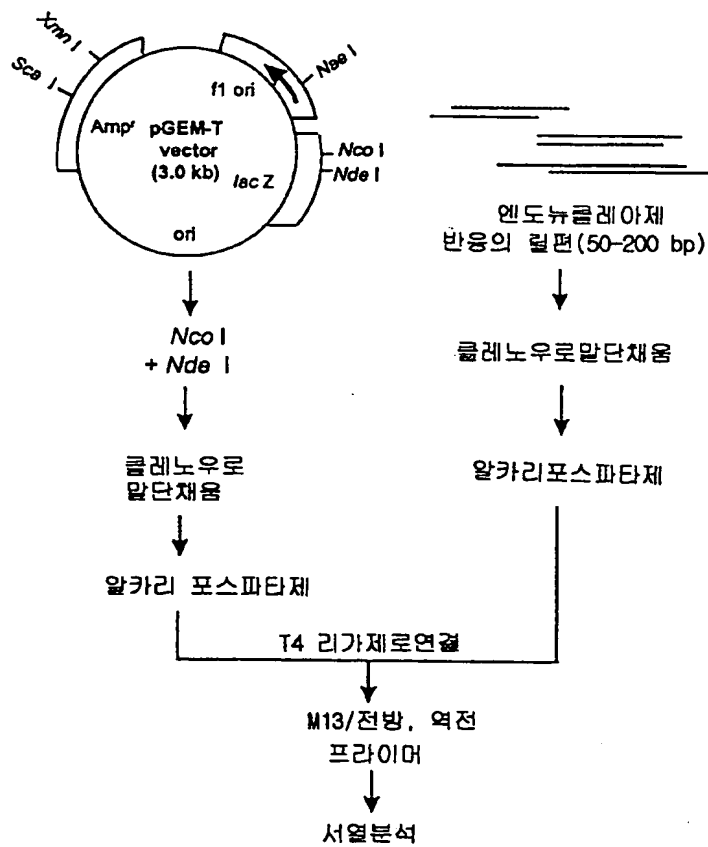
【도 19】



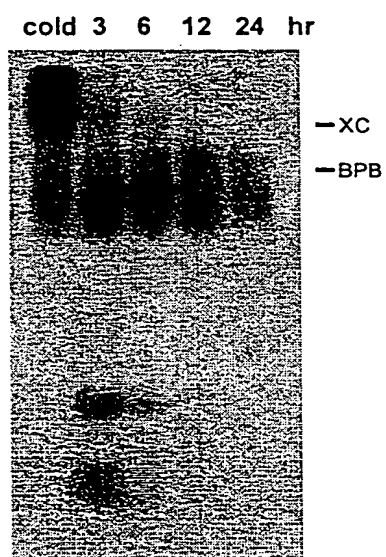
【도 20】



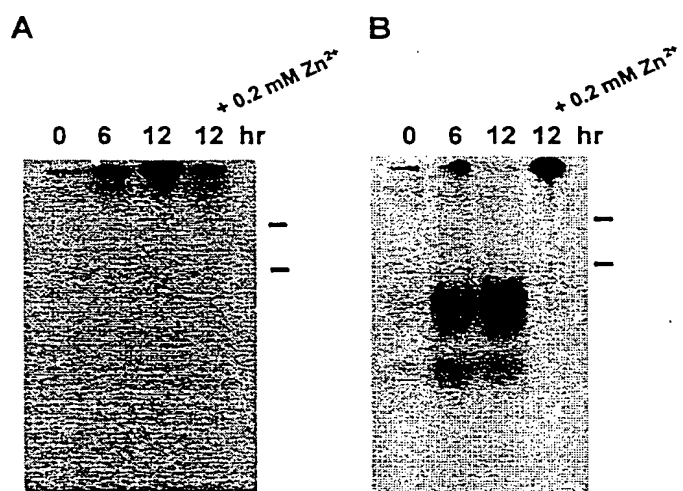
【도 21】



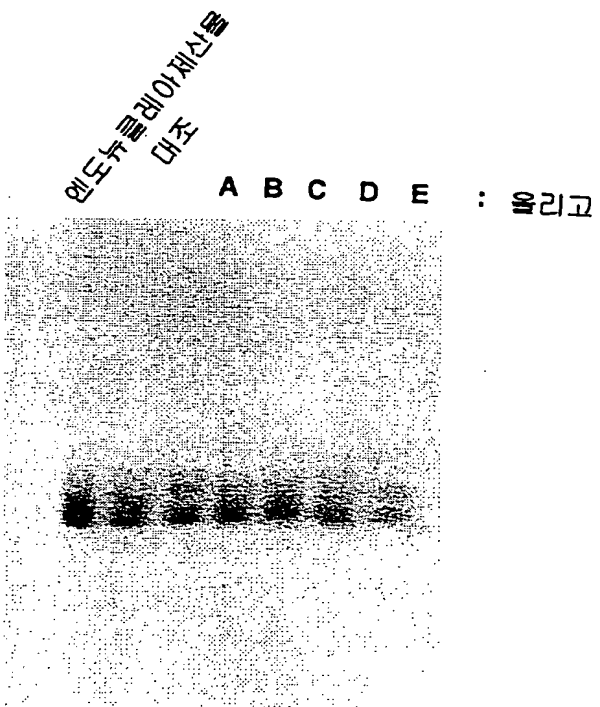
【도 22】



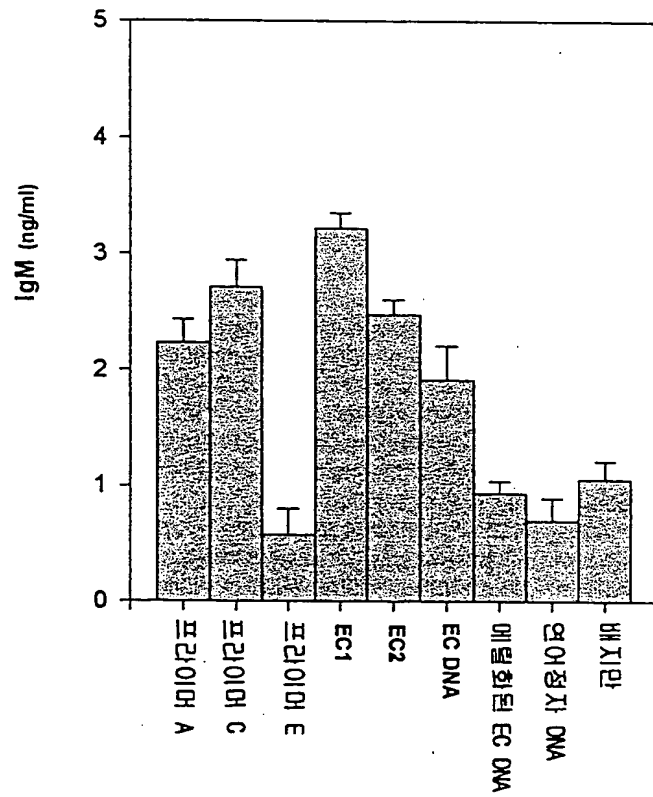
【図 23】



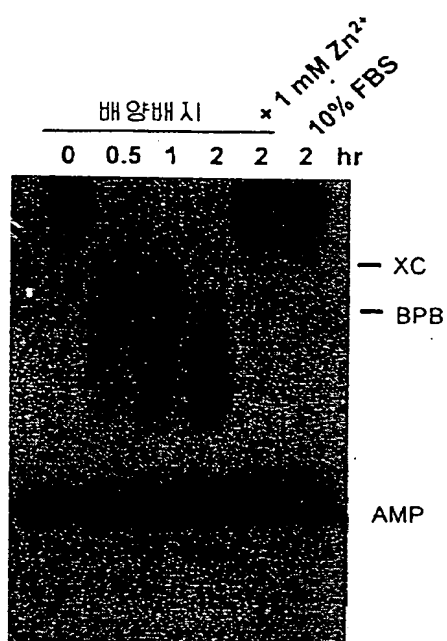
【도 24】



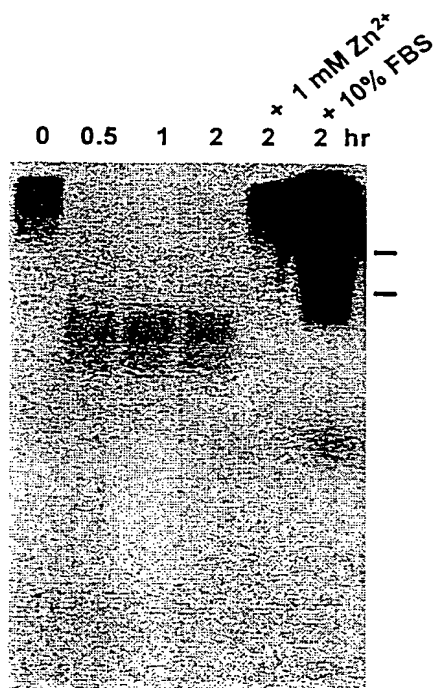
【도 25】



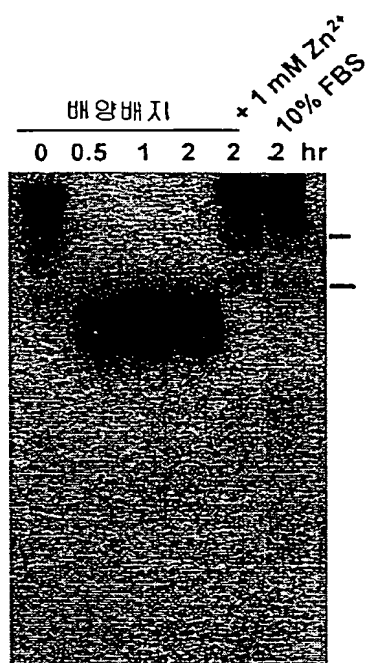
【도 26】



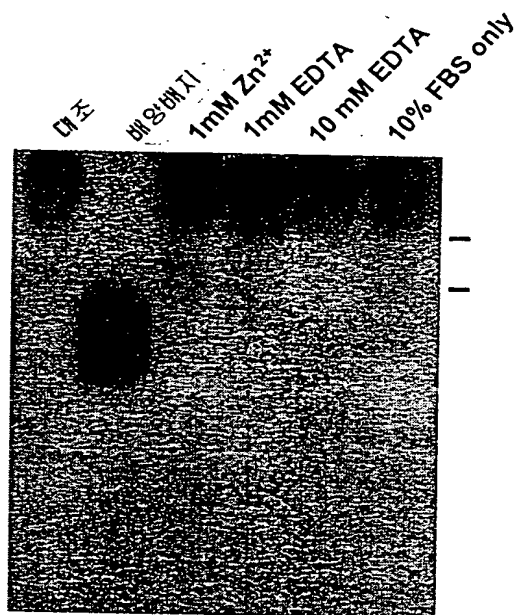
【도 27】



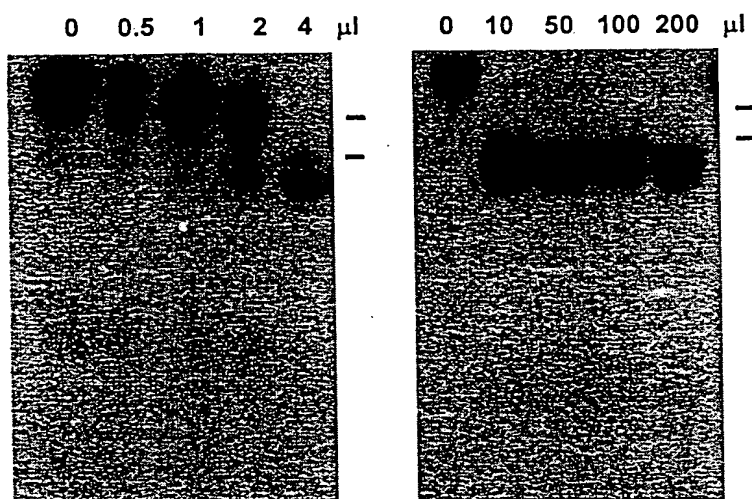
【도 28】



【도 29】

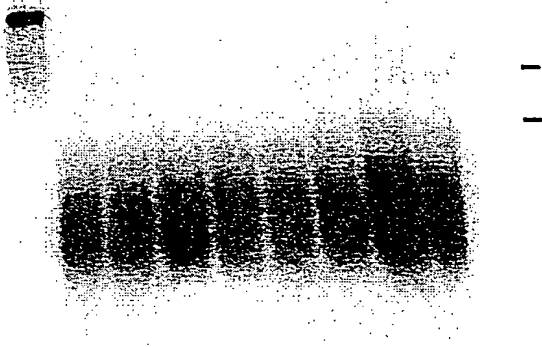


【도 30】

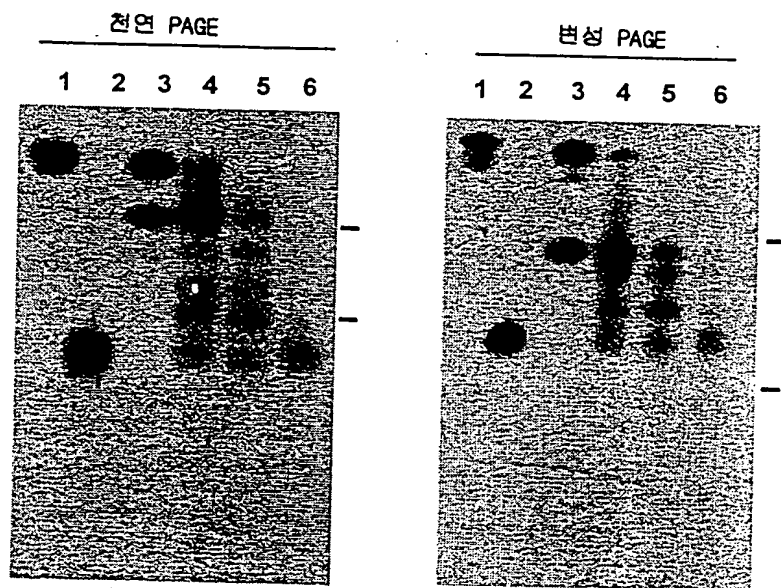


【도 31】

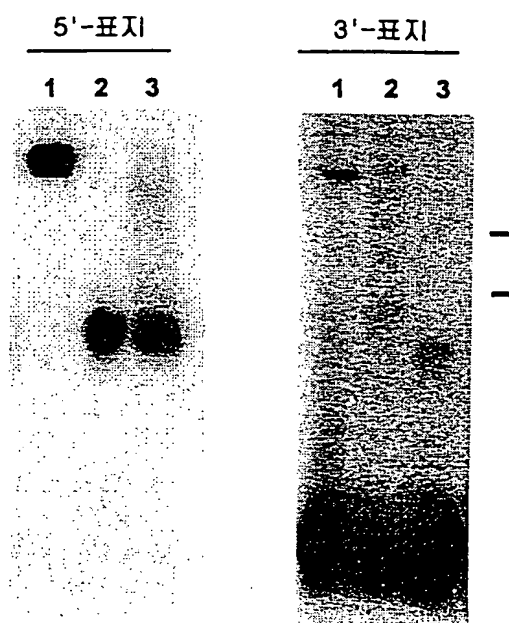
0 0.5 1 2 4 8 12 16 24 : 시간 (hr)



【도 32】

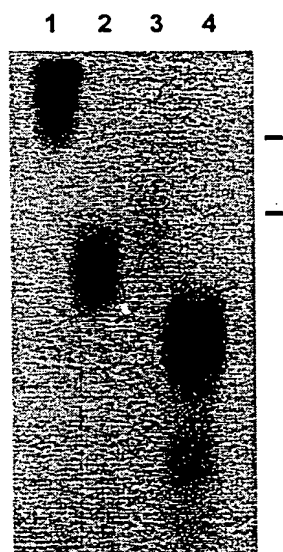


【도 33】

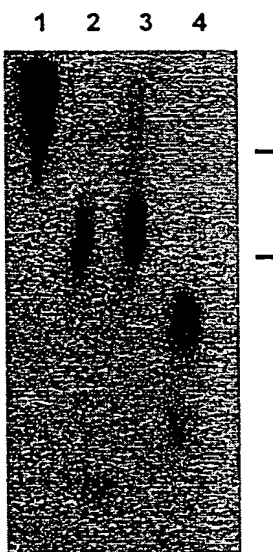


【도 34】

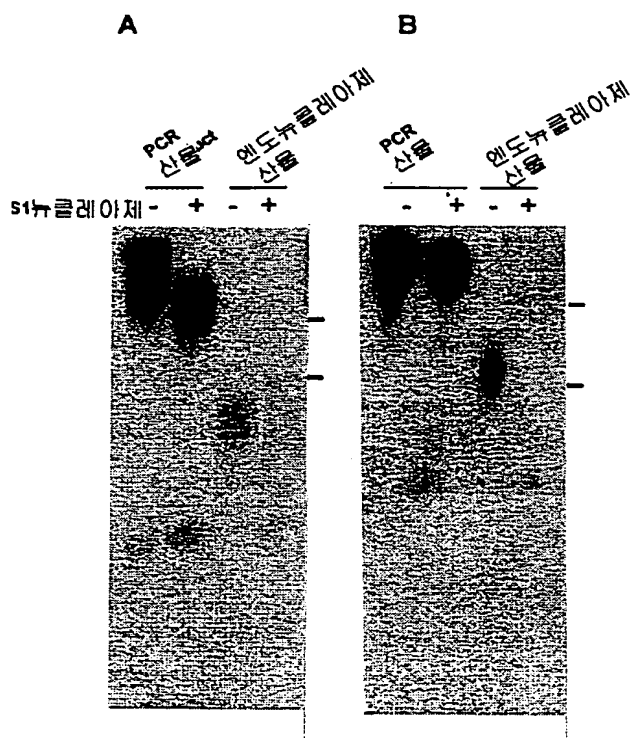
A



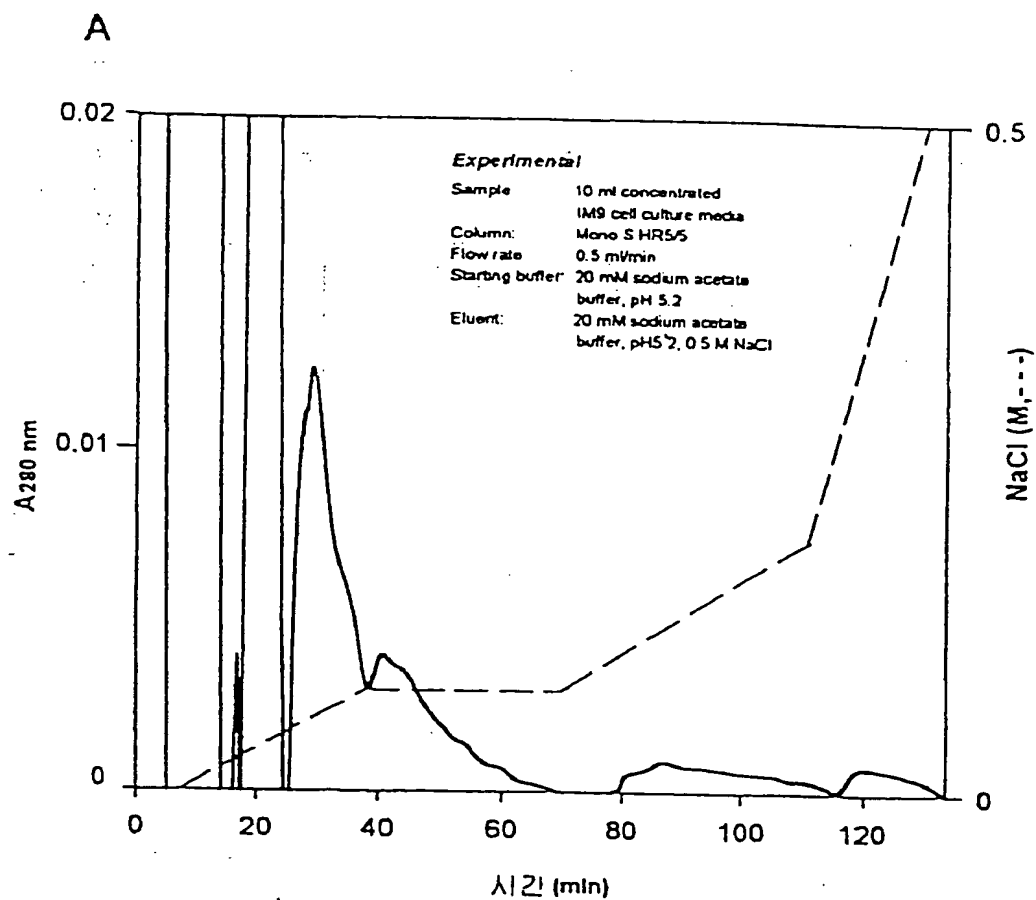
B



【도 35】



【도 36】



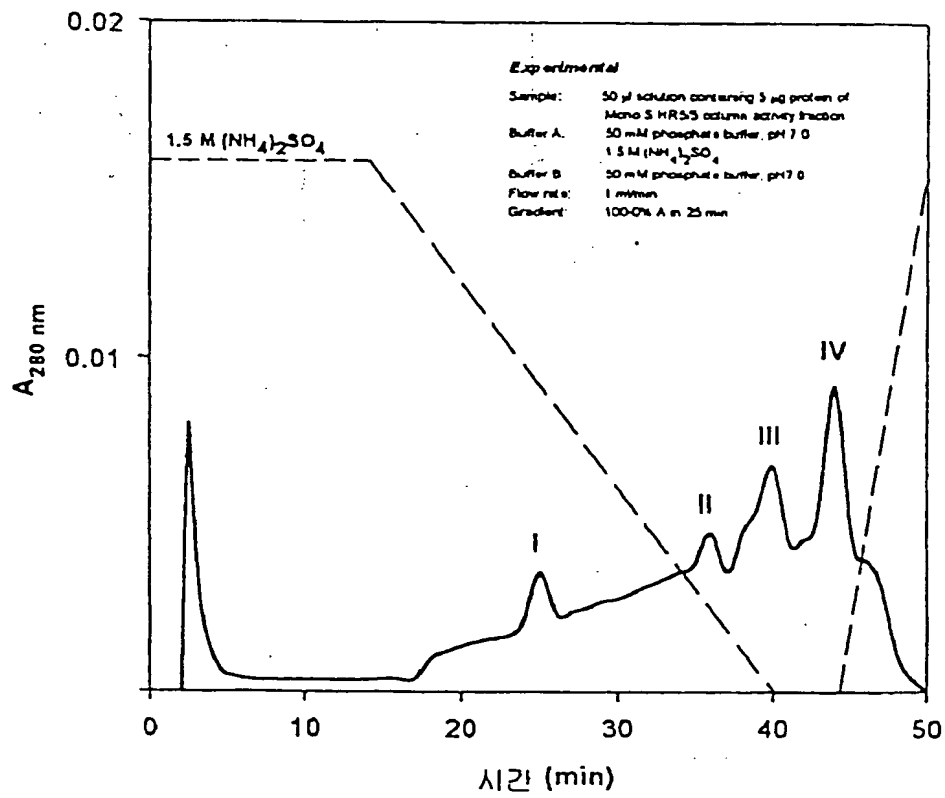
B

c 10 20 30 40 50 60 70 80 83 86 89 92 95 98 101 104 : 채류시간 (min)

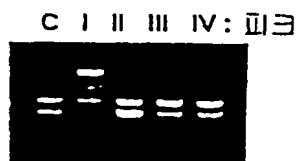


【도 37】

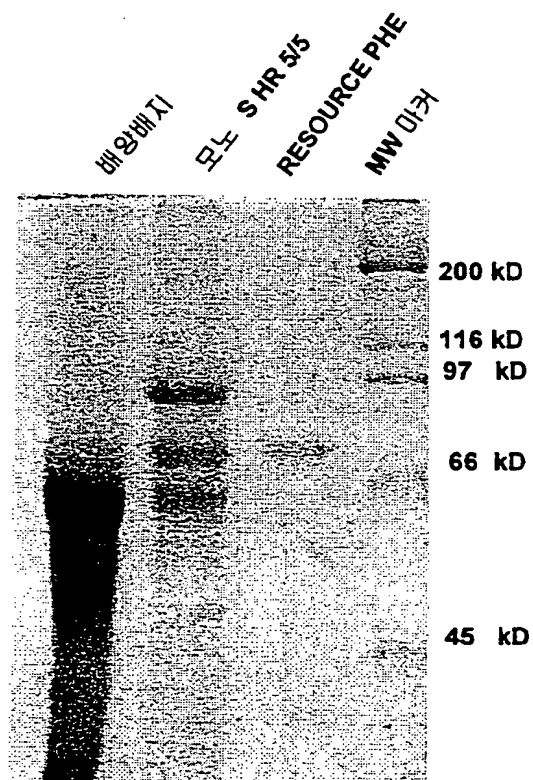
A



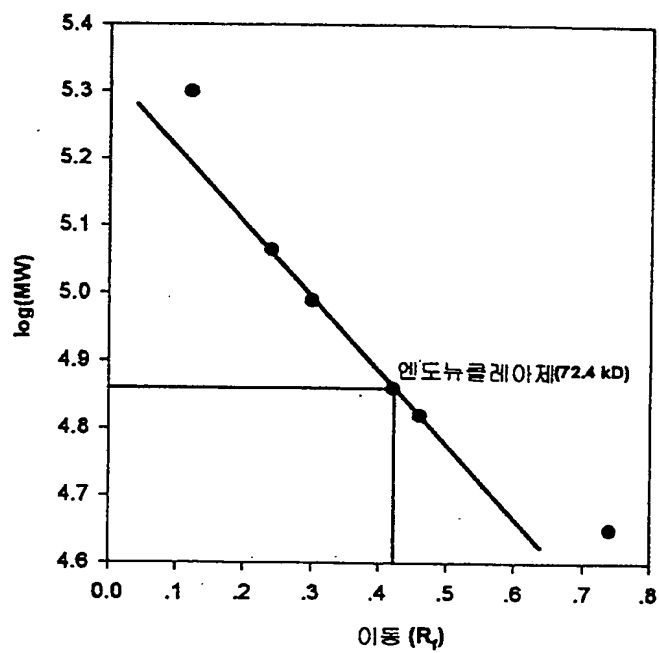
B



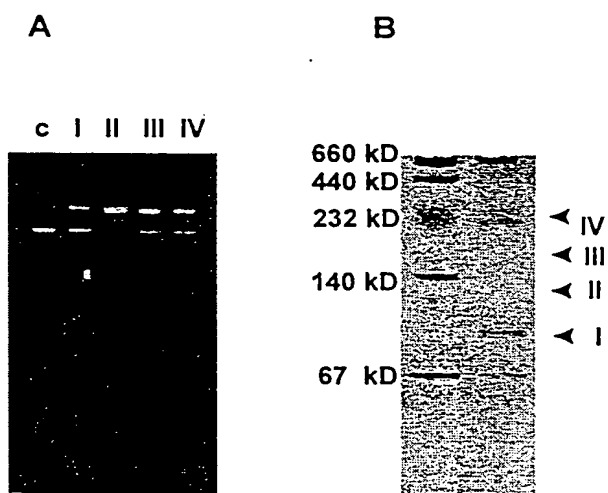
【도 38】



【도 39】



【도 40】



【도 41】



【도 42】

